

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA



Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea in Biologia applicata alla Biomedicina

*CELLULE ALFA E FUNZIONALITA' PANCREATICA:
EFFETTO DELLE PERTURBAZIONI METABOLICHE TIPICHE DEL DIABETE
MELLITO TIPO 2 NELLA SINTESI E SECREZIONE DI GLUCAGONE E GLP-1*

Tesi di Laurea

Relatori:

Prof. Stefano DEL PRATO

Dr. Roberto LUPI

Candidato:

Faro Giuseppe

Anno Accademico 2012/2013

A mio padre...

*Stolto è colui che
cerca di ottenere risultati differenti compiendo le stesse
azioni...*

(Albert Einstein)

Riassunto

Il diabete mellito è una sindrome eterogenea, comprendente varie forme cliniche, di cui le più frequenti sono il diabete tipo 1, caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina, dovuto alla distruzione autoimmune delle cellule beta delle isole di Langerhans, e, soprattutto, il diabete tipo 2, in cui sono presenti, oltre alla carenza di insulina, fenomeni di resistenza all'azione dell'ormone. In questi ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nello studio e nella valutazione funzionale delle isole pancreatiche, che costituiscono non più dell'1-2% della massa pancreatica complessiva. Sono strutture che contengono vari tipi di cellule endocrine, di cui le più rappresentate sono le cellule beta produttrici di insulina (60-80%) e le cellule alfa produttrici di glucagone (20-30%). In questi ultimi anni i ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione principalmente sullo studio delle cellule beta-pancreatiche, andando a studiarne i meccanismi che regolano la sintesi ed il rilascio dell'insulina, nonché dalla massa complessiva delle cellule stesse. Tuttavia, in letteratura sono presenti pochi studi riguardo al ruolo delle cellule alfa nella funzionalità insulare. Le cellule alfa sintetizzano e rilasciano il glucagone. Tale ormone è il risultato finale di una serie di modifiche a carico del proglucagone, che rappresenta il reale polipeptide derivante dalla trascrizione del gene corrispondente. L'azione di enzimi proteolitici con specificità tissutale porta, infatti, attraverso clivaggi successivi, dal proglucagone al glucagone nelle cellule alfa e al GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) e GLP-2 (Glucagon-like peptide 2) nelle cellule L dell'intestino. Recentemente, è stato pubblicato uno studio portato avanti nel nostro laboratorio in cui abbiamo dimostrato la presenza di un sistema di produzione del GLP-1 nelle isole pancreatiche umane, che risiede nelle cellule alfa e potrebbe essere alterato nei pazienti con diabete mellito tipo 2. In vivo, il GLP-

1 stimola la secrezione insulinica, riduce o sopprime il rilascio di glucagone (che risulta inappropriatamente elevato nei pazienti diabetici di tipo 2) e incrementa la massa di cellule beta stimolando la rigenerazione delle cellule pancreatiche.

Poiché in letteratura sono pochi o assenti gli studi riguardanti la produzione e il ruolo del GLP-1 da parte delle alfa cellule pancreatiche, lo scopo della mia tesi è stato quello di valutare la secrezione e la funzione dell'incrétina in una linea cellulare di alfa cellule murine esposte o meno a perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito tipo 2.

Abstract

Diabetes mellitus is a heterogeneous syndrome, comprising various clinical forms, of which the most frequent are diabetes type 1, characterized by more or less total deficit of insulin secretion, due to autoimmune destruction of the beta cells of the islets of Langerhans, and, especially, diabetes type 2, in which they are present, in addition to the deficiency of insulin, the phenomena of the resistance to the action of the hormone.

There has been remarkable progress in the study and functional assessment of the pancreatic islets, which constitute no more than 1 to 2% of the total pancreatic mass. Are structures that contain various types of endocrine cells, of which the most represented are the insulin-producing beta cells (60-80%) and the glucagon producing alpha cell (20-30%)

In recent years, researchers have focused their attention primarily on the study of pancreatic beta-cells, going to study the mechanisms that regulate the synthesis and release of insulin, as well as the total mass of the cells themselves. However, in the literature there are few studies about the role of alpha cells in the islet functionality.

Alpha cells synthesize and release glucagon. This hormone is the final result of a series of changes in load of pro-glucagon, which represents the real polypeptide resulting from the transcription of the corresponding gene. The action of proteolytic enzymes with tissue specificity door, in fact, through subsequent cleavage from proglucagon to glucagon in alpha cells and GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and GLP-2 (glucagon-like peptide 2) in L cells the intestine.

In vivo, GLP-1 stimulates insulin secretion, reduces or suppresses the release of glucagon (which is inappropriately elevated in patients with type 2 diabetes) and increases beta cell mass by stimulating the regeneration of pancreatic cells.

Recently, it was published a study carried out in our laboratory in which we demonstrated the presence of a system of production of GLP-1 in human pancreatic islets, which lie in the alpha cells and may be altered in patients with type 2 diabetes mellitus.

Capitolo 1. Sommario

CAPITOLO 1. SOMMARIO	8
CAPITOLO 2. INTRODUZIONE	10
2.1 CENNI SUL DIABETE MELLITO	11
2.2 DIABETE MELLITO DI TIPO 2	13
2.3 STRUTTURA DEL PANCREAS	15
2.4 DIABETE DI TIPO 2 E BETA-CELLULA	17
2.5 DIABETE DI TIPO 2 E ALFA-CELLULA	18
2.6 DIABETE TIPO 2, GLUCOTOSSICITÀ E LIPOTOSSICITÀ	19
2.7 RUOLO DELLE INCRETINE	24
CAPITOLO 3. SCOPO DELLA TESI	31
CAPITOLO 4. MATERIALI E METODI	32
4.1 LINEA CELLULARE ALFA -TC1 E CONDIZIONI DI COLTURA	32
4.2 COLTURA CELLULARE	32
4.3 ATTIVITÀ METABOLICA	33
4.4 VITALITÀ CELLULARE	34
4.5 VALUTAZIONE TASSO APOPTOSI	35
4.6 IMMUNOFLUORESCENZA	37
4.7 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE	40
4.8 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA MESSAGGERO	42
4.9 PCR REAL-TIME	43
4.10 ANALISI DELLA CURVA DI MELTING	43
4.11 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI PC1/3, PC2 E BETA-ACTINA (BA) MEDIANTE REAL-TIME RT-PCR CON SYBER GREEN	47
4.12 QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA CON METODICA REAL-TIME RT-PCR TAQMAN	49
4.13 DOSAGGIO PROTEICO CON IL METODO BRADFORD	50
4.14 DETERMINAZIONE DELLA SECREZIONE ORMONALE:ELISA	51
4.15 ANALISI STATISTICA	59
CAPITOLO 5. RISULTATI	60
5.0 STUDIO DEL GLP-1 IN ALFA-CELLULE PANCREATICHE MURINE (A-TC1CLONE 6) ESPOSTE AD ALTO GLUCOSIO.	60

5.1	CARATTERISTICHE LINEA CELLULARE STUDIATA	60
5.2	ATTIVITÀ METABOLICA E VITALITÀ CELLULARE	61
5.3	PRESENZA DI GLP-1R, PC1/3 E PC2 NELLE CELLULE A-TC1CLONE 6	61
5.3.1	STUDI DI IMMUNOFLUORESCENZA	63
5.4	STUDI DI ESPRESSIONE GENICA	65
5.4.1	ESPRESSIONE GENICA PER GLUT-2	65
5.4.2	ESPRESSIONE GENICA PER GLP-1R	66
5.4.3	ESPRESSIONE GENICA PER PC1/3 E PC2.	67
5.5	RISULTATI STUDI SECREZIONE GLP-1 VALUTAZIONE DEL GLP-1 TOTALE, ATTIVO E RAPPORTO ATTIVO/TOTALE IN CELLULE A-TC1CLONE 6 ESPOSTE A GLUCOSIO 16.7 MMOL/L.	68
5.6	RISULTATI DEGLI STUDI DI SECREZIONE DEL GLUCAGONE	70
5.7	STUDIO DEL GLP-1 IN ALFA-CELLULE PANCREATICHE MURINE (A-TC1CLONE 6) ESPOSTE AD ELEVATA CONCENTRAZIONE DI ACIDI GRASSI LIBERI (FFA)	72
5.7.1	VITALITÀ CELLULARE	72
5.7.2	VALUTAZIONE DEL TASSO DI APOPTOSI CELLULARE	73
5.7.3	STUDI DI ESPRESSIONE GENICA	74
5.7.3.1	ESPRESSIONE GENICA PER GLP-1R	74
5.7.3.2	ESPRESSIONE GENICA PER PC1/3 E PC2.	75
5.7.4	RISULTATI DEGLI STUDI DI SECREZIONE DEL GLP-1. VALUTAZIONE DEL GLP-1 TOTALE, ATTIVO E RAPPORTO ATTIVO/TOTALE IN CELLULE A-TC1CLONE 6 ESPOSTE A FFA 0.5 MMOL/L.	77
CAPITOLO 6. DISCUSSIONE DEI RISULTATI		81
CAPITOLO 7. BIBLIOGRAFIA		87
CAPITOLO 8. RINGRAZIAMENTI		98

Capitolo 2. Introduzione

Il diabete mellito viene definito come una patologia cronica che comprende varie forme cliniche, di cui le più frequenti sono il diabete tipo 1, caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina per distruzione autoimmune delle cellule beta-pancreatiche e, soprattutto, il diabete tipo 2, in cui sono presenti, oltre alla carenza di insulina, fenomeni di resistenza all'azione dell'ormone^{1,2,3,4,5,6}. Organo bersaglio di questa patologia è il pancreas e, in particolare, la parte endocrina presente nella ghiandola e formata principalmente da beta-cellule ed alfa-cellule. In questi ultimi anni i ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione principalmente sullo studio delle beta-cellule pancreatiche, andando a studiarne i meccanismi che regolano la sintesi e il rilascio dell'insulina, nonché dalla massa complessiva delle cellule stesse. Per questo motivo, in letteratura sono presenti pochi studi riguardo al ruolo delle alfa-cellule nella funzionalità insulare, il cui ruolo è quello di sintetizzare e rilasciare il glucagone. Tale ormone è il risultato finale di una serie di modifiche a carico del pro-glucagone, che rappresenta il reale

¹ Brunton S. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. *Postgrad Med.*, 121(5):68{81, 2009.

² Lau DC. Metabolic syndrome: perception or reality? *Curr Atheroscler Rep.*, 11(4):264{271, 2009.

³ Goldberg E and Krause I. Infection and type 1 diabetes mellitus - a two edged sword? *Autoimmun Rev.*, 8(8):682{6, 2009.

⁴ Concannon P, Rich SS, and Nepom GT. Genetics of type 1a diabetes. *N Engl J Med.*, 360(16):1646{54, 2009

⁵ S. Brunton. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. *Postgrad Med.*, 121:68{81, 2009.

⁶ Bode BW. De_ning the importance of daily glycemic control and implications for type 2 diabetes management. *Postgrad Med.*, 121(5):82{93, 2009.

polipeptide derivante dalla trascrizione del gene corrispondente. L'azione di enzimi proteolitici con specificità tissutale porta, infatti, attraverso clivaggi successivi, dal proglucagone al glucagone nelle cellule alfa e al GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) e GLP-2 (Glucagon-like peptide 2) nelle cellule L dell'intestino. In vivo, il GLP-1 stimola la secrezione insulinica, riduce o sopprime il rilascio di glucagone (che risulta inappropriatamente elevato nei pazienti diabetici di tipo 2) e incrementa la massa di cellule beta stimolando la rigenerazione delle cellule pancreatiche.

Recentemente, è stato pubblicato uno studio portato avanti nel nostro laboratorio in cui abbiamo dimostrato la presenza di un sistema di produzione del GLP-1 nelle isole pancreatiche umane, che risiede nelle cellule alfa e che potrebbe essere alterato nei pazienti con diabete mellito tipo 2.

2.1 Cenni sul diabete mellito

Il termine diabete mellito descrive un disordine metabolico a eziologia multipla, caratterizzato da iperglicemia cronica con alterazioni del metabolismo dei carboidrati, dei grassi e delle proteine, a causa di difetti della secrezione e/o dell'azione insulinica. Questa patologia viene definita una sindrome eterogenea poiché comprende varie forme cliniche⁷, di cui le più frequenti sono il diabete di tipo 1 e il diabete di tipo 2, che da soli rappresentano oltre il 90% di tutti i casi¹⁻⁶. Nel diabete di tipo 1 si ha una distruzione autoimmune delle cellule beta delle isole di Langerhans, a cui consegue una totale assenza di insulina, mentre nel diabete di tipo 2 si ha una ridotta secrezione insulinica, associata ad una resistenza da parte dei tessuti all'azione dell'ormone stesso. La prevalenza (numero di persone che hanno il diabete in percentuale sulla popolazione totale) e l'incidenza (numero di nuovi

⁷ American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2006;29 (suppl 1):S43:8.;

casi per anno in rapporto alla popolazione totale) del diabete variano notevolmente in rapporto alla zona geografica considerata^{8,9}. Attualmente in Italia si ritiene che il numero dei pazienti diabetici sia circa 2.5 milioni e, in base alle previsioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il numero dei pazienti sembra destinato ad un continuo e rapido aumento¹⁰.

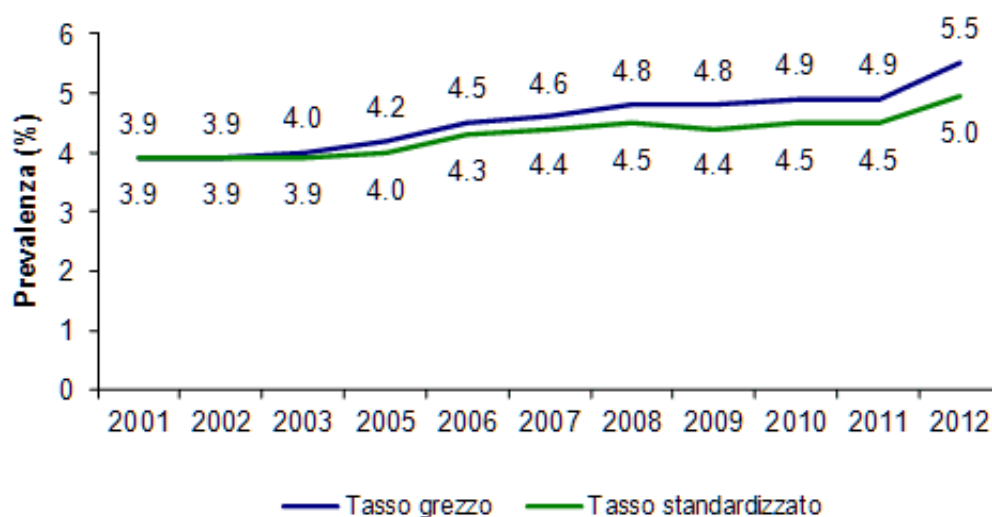


Figura 1. Andamento della prevalenza del diabete in Italia. Fonte: Istat 2012, elaborazione Iss -<http://www.epicentro.iss.it>.

⁸ inter E, Simko V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. Adv Exp Med Biol. 2012;771:42-50. Review

⁹ Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 2001;414:782-7;

¹⁰ Istat 2012, elaborazione Iss -<http://www.epicentro.iss.it>.

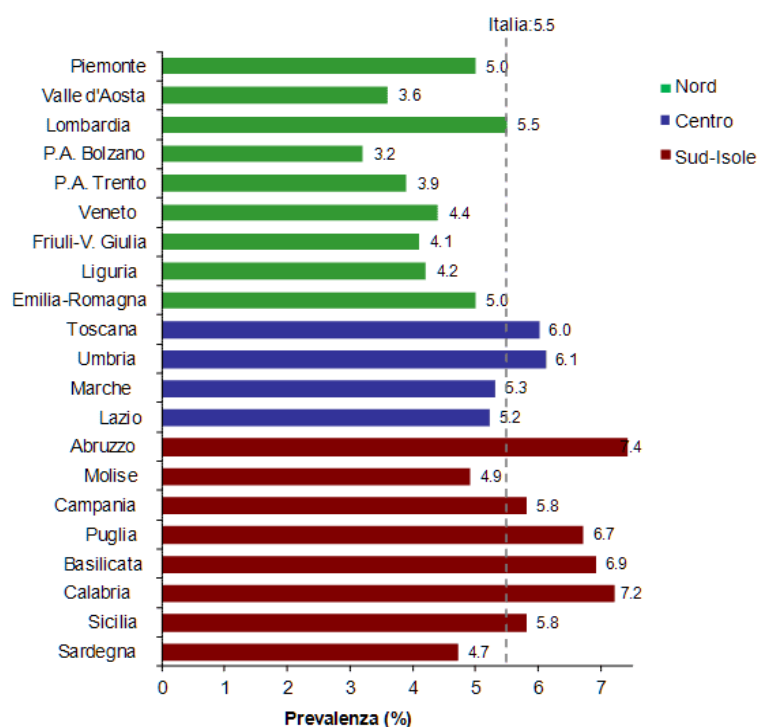


Figura 2. Prevalenza del diabete nelle regioni italiane. Fonte: Istat 2012, elaborazione Iss - <http://www.epicentro.iss.it>.

Questa patologia viene considerata la più importante malattia sociale contemporanea con un impatto socio-sanitario di estrema rilevanza, anche perché caratterizzata da complicanze di tipo acuto e di tipo cronico.

2.2 *Diabete mellito di tipo 2*

Il diabete mellito tipo 2, o diabete non insulino dipendente, è un tipo di diabete ad esordio generalmente più tardivo rispetto al tipo 1, caratterizzato da insulino resistenza e da alterazione della funzione dell'isola di Langerhans. Questa forma di diabete colpisce circa il 5-10% della popolazione dei paesi industrializzati e rappresenta quasi il 90% di tutti i casi di diabete mellito^{11,12}.

¹¹ American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2006;29 (suppl 1):S43:8.

E' una patologia a eziologia multifattoriale, in quanto è causata da fattori sia genetici che ambientali non del tutto noti e con meccanismi d'azione in buona parte ancora da chiarire. E' una patologia subdola poichè la sua insorgenza spesso viene scoperta casualmente o può non essere affatto scoperta se non dopo molti anni a causa della comparsa delle complicanze.

Come accennato, esistono dunque differenti possibili cause che portano all'insorgenza di questo tipo di diabete: tra i fattori ambientali hanno un'importanza prioritaria l'obesità e l'inattività fisica. Anche l'età favorisce la comparsa del diabete, poiché essa si accompagna a una riduzione fisiologica della sensibilità dei tessuti periferici all'insulina. Questi fattori causali (eziologici) provocano la malattia attraverso il concorso di due meccanismi principali (patogenesi): l'alterazione della secrezione d'insulina e la ridotta sensibilità dei tessuti bersaglio (muscolo, fegato e tessuto adiposo) alla sua azione (insulino-resistenza); pertanto non è causato da una diminuzione assoluta dell'insulina, ma piuttosto da una ridotta azione dell'ormone a livello dei tessuti "bersaglio". Infatti, dal punto di vista funzionale, il comportamento della secrezione insulinica da parte della beta-cellula nel corso della storia naturale del diabete di tipo 2 è variabile, con livelli di insulinemia che, in termini assoluti, possono essere aumentati, normali o ridotti, ma che sono insufficienti a garantire una normale glicemia¹³. Di notevole importanza è il fatto che la secrezione di insulina in risposta a stimoli diversi dal glucosio (arginina e/o sulfaniluree) è parzialmente conservata^{14,15}.

¹² Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414:782-7

¹³ Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, Novelli M, Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M, Soleti A, Filipponi F, Mosca F, Boggi U, Del Prato S, Masiello P, Marchetti P. Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. *Diabetes Metab.* 2007 Nov;33(5):340-5.

¹⁴ Kahn SE. The relative contribution of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003;46:3-19.

Numerosi polimorfismi di geni in grado di influenzare la sopravvivenza e la funzione della beta-cellula sono stati descritti recentemente, ed è questo un settore in evoluzione continua. Tra i fattori acquisiti, assumono particolare importanza la glucotossicità e la lipotossicità, vale a dire i danni indotti dalla prolungata esposizione delle beta-cellule a elevate concentrazioni, rispettivamente, di glucosio o acidi grassi. D'interesse e incoraggianti appaiono alcuni dati che dimostrano come la sofferenza della beta-cellula nel diabete di tipo 2 possa essere direttamente prevenuta o fatta regredire da adeguati trattamenti farmacologici.

2.3 *Struttura del pancreas*

Il pancreas è una ghiandola che si trova nello spazio retroperitoneale a contatto con la parete addominale posteriore. Si possono distinguere una parte verticale che rappresenta la testa, una parte orizzontale chiamato corpo, una zona di unione fra le due parti denominata collo e una terminale che prende il nome di coda. È una ghiandola di dimensioni limitate, pesa circa 75-100 grammi, raggiunge il massimo sviluppo intorno ai 40 anni e, successivamente, va incontro ad una lenta e progressiva involuzione. Il pancreas è formato da una parte endocrina e un'esocrina, dotate di specificità funzionale e almeno in apparenza indipendenti. Le cellule esocrine (acinare) del pancreas sintetizzano degli enzimi in grado di digerire i diversi costituenti del cibo: i grassi, gli amidi e le proteine. Le cellule endocrine, chiamate isole di Langerhans, producono diversi ormoni, tra cui l'insulina e il glucagone, responsabili della regolazione del metabolismo del glucosio. Le isole rappresentano non più del 2% della massa pancreatica complessiva e al microscopio appaiono rotondeggianti con

¹⁵ Ferrannini E, Mari A. Beta-cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal. *Diabetologia* 2004;47:943-56.

dimensioni che variano, nell'uomo, da 50 a 400 μm di diametro¹⁶. Esse contengono vari tipi di cellule endocrine, di cui le più rappresentate sono le cellule beta secernenti insulina (60-80%), le cellule alfa che rilasciano glucagone (20% circa) e le cellule delta (5% circa) producenti somatostatina^{17,18} (**Figura 3**).

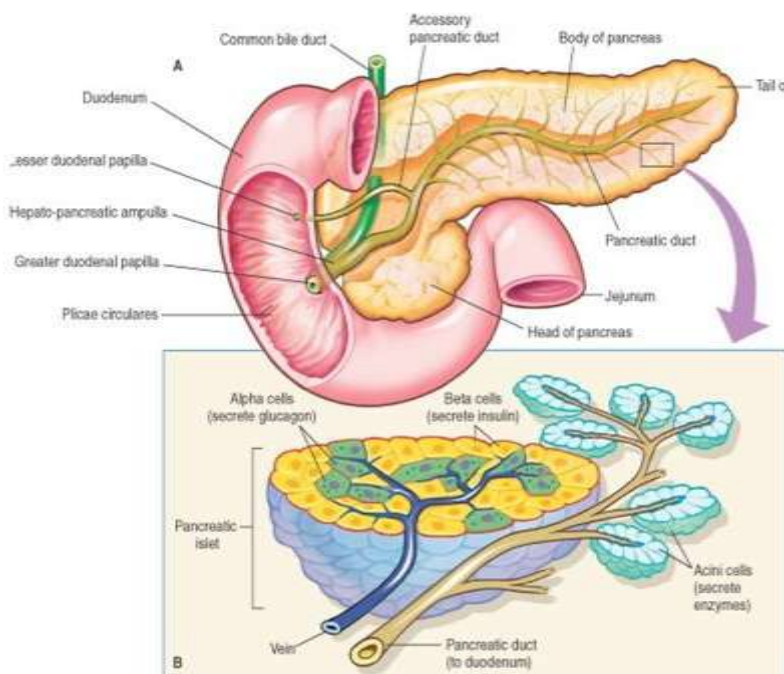


Figura 3. Anatomia del pancreas, isole del Langerhans e tessuto esocrino. Fonte: <http://www.baileybio.com>

¹⁶ The Islets of Langerhans Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 654 Islam, Md. Shahidul (Ed.). 2010.

¹⁷ Proietto J, Nankervis A, Aitken P, Caruso G, Alford F. Glucose utilization in Type 1. Csorba TR, Lyon AW, Hollenberg MD. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. Crit Rev Clin Lab Sci. 2010, 47(2):51-71

¹⁸ Gero L. Type 1 diabetes mellitus: pathogenesis, symptoms and therapy]. Orvb Hetil, 2010, 151((13):533-9. Review

2.4 *Diabete di tipo 2 e beta-cellula*

Le beta cellule rappresentano circa l'80% delle cellule che compongono l'isola del Langerhans. La loro funzione è di produrre e secernere l'insulina in modo da mantenere le concentrazioni circolanti di glucosio nel loro intervallo fisiologico. È stato calcolato che in un'isola di medie dimensioni (100-150 micron) ci sono circa 1000-1200 cellule beta, contenenti ciascuna circa 10000 granuli di insulina: poichè il numero di isole nel pancreas si aggira intorno a 500000-1000000, il numero di beta-cellule è molto elevato.

Il regolatore più importante della secrezione insulinica è il glucosio, anche se numerosi altri nutrienti, così come vari ormoni, neurotrasmettitori e farmaci possono influenzare il rilascio dell'ormone. E' oramai noto che il glucosio, dopo essere entrato nella cellula beta per opera dei glucotrasportatori come GLUT2 e GLUT1, sia fosforilato dall'enzima glucochinasi e quindi avviato lungo la cascata glicolitica. Il piruvato che si forma entra nel mitocondrio e, attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici e i successivi eventi a livello della catena respiratoria mitocondriale, si arriva alla produzione di ATP. L'aumento del rapporto ATP/ADP (adenosin-difosfato) induce la chiusura, a livello della membrana cellulare, dei canali del potassio ATP-dipendenti, cui conseguono depolarizzazione della membrana, apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, ingresso nella cellula di ioni calcio, con esocitosi dei granuli d'insulina. La massa beta-cellulare è prevalentemente regolata dall'apoptosi, dalle dimensioni delle singole cellule beta, dalla replicazione e dalla neogenesi cellulare^{19,20}. Nei primi anni di vita la massa beta-cellulare aumenta notevolmente, grazie a fenomeni replicativi e di

¹⁹ Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regul Pept* 2008;146:4-11; Rhodes CJ. Type 2 diabetes - a matter of beta-cell life and death *Science* 2005;307:380-4

²⁰ Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regul Pept* 2007;29;

neogenesi. Successivamente, si raggiunge una sorta di equilibrio, che viene poi mantenuto, di solito, durante la vita adulta⁹. Nel tempo, i fenomeni apoptotici tendono a prevalere su quelli rigenerativi, la massa cellulare si riduce leggermente e le cellule beta sono in grado di adattarsi alle nuove circostanze. In particolare, in caso di sovrappeso/obesità, l'insulino-resistenza che ne deriva è compensata da un accentuato tasso di replicazione e neogenesi e dall'aumento di dimensioni delle singole cellule⁹.

2.5 *Diabete di tipo 2 e alfa-cellula*

Come accennato prima, solo in questi ultimi anni i ricercatori hanno cominciato a valutare il ruolo e la funzione dell'alfa-cellula all'interno della stessa isola pancreatica²¹. Nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 le concentrazioni circolanti di glucagone si sono rivelate più elevate di quanto atteso in presenza dei corrispondenti livelli glicemici a digiuno²², contribuendo all'aumento della produzione epatica di glucosio nei soggetti diabetici. Inoltre, nel diabete di tipo 2 è stato dimostrato che le alfa-cellule hanno una ridotta capacità di riconoscere l'effetto inibitorio dell'iperglicemia²³. Qualche autore ha suggerito che le alfa-cellule di pazienti diabetici possano essere resistenti all'azione inibitoria dell'insulina prodotta dalle beta-cellule pancreatiche²⁴.

Rispetto a soggetti sani, nei pazienti con diabete mellito tipo 2 la secrezione di glucagone aumenta dopo stimolo con arginina, a dimostrare

²¹ Christensen M, Bagger JI, Vilsbøll T, Knop FK. The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy. *Rev Diabet Stud.* 2011 Fall;8(3):369-81.

²² Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes* 1987;36:274-83

²³ Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S. Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:504-10

²⁴ H, et al. Abnormal glucagon response to arginine and its normalization in obese hyperinsulinemic patients with glucose intolerance: importance of insulin action on pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 1991;34:801-6

come l'effetto inibitorio dell'insulina, la cui produzione viene stimolata dallo stesso aminoacido, sia particolarmente ridotta in questi pazienti e come i meccanismi regolatori all'interno dell'isola di Langerhans siano alterati^{25,26}. Per quanto riguarda la quantità delle cellule alfa nelle isole pancreatiche, alcuni autori hanno riportato un aumento del volume delle cellule nel diabete di tipo 2 relativamente al volume pancreatico²⁷. Inoltre, è stato documentato che nei pazienti diabetici c'è un aumento proporzionale del numero di alfa-cellule rispetto alle beta-cellule²⁸.

Sebbene sia necessario approfondire con ulteriori studi le caratteristiche di risposta delle cellule alfa al glucosio, all'insulina e ad altre molecole (in particolare l'arginina), è verosimile che tali cellule presentino alterazioni funzionali che possono contribuire, insieme a un aumento della loro quantità proporzionale, allo sviluppo e alla progressione del diabete di tipo 2.

2.6 *Diabete tipo 2, glucotossicità e lipotossicità*

Come già accennato, nel diabete mellito di tipo 2 vari fattori genetici e acquisiti contribuiscono alla riduzione della funzione e della sopravvivenza della beta-cellula²⁹. Numerosi geni sono stati associati ad alterazioni beta-cellulari e tra questi ve ne sono che codificano per vari fattori di trascrizione,

²⁵ Unger RH, Aguilar-Parada E, Muller WA, Eisentraut AM. Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1970;49:847-8

²⁶ D'Alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2011 Oct;13 Suppl 1:126-32.

²⁷ Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2300-8

²⁸ Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, et al. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2004;53:624-32

²⁹ Andovici I, Hammerle CM, Ozanne SE, Constância M. Developmental and environmental epigenetic programming of the endocrine pancreas: consequences for type 2 diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2013 May;70(9):1575-95.

per proteine coinvolte nel metabolismo del glucosio, per molecole implicate nel segnale insulinico e vari altri^{30,31}.

Tra i fattori acquisiti, certamente la glucotossicità (dovuta a prolungata esposizione a elevate concentrazioni di glucosio) e la lipotossicità (causata da eccessivi livelli di acidi grassi) svolgono un ruolo importante nell'influenzare la sopravvivenza delle beta-cellule^{32,33,34,35}. La patogenesi del diabete mellito di tipo 2 è complessa e multifattoriale ma poggia fundamentalmente sulla presenza dell'insulinoresistenza (IR)³⁶. Questa è caratterizzata a livello epatico da: un'aumentata gluconeogenesi con conseguente iperglicemia a digiuno, un'accentuata lipolisi a livello del tessuto adiposo viscerale con incremento degli acidi grassi liberi (FFA) circolanti, una ridotta captazione muscolare di glucosio e una ridotta secrezione insulinica che ha come epifenomeno una più accentuata escursione iperglicemia post-prandiale. La glucotossicità da iperglicemia cronica e la lipotossicità da eccesso di FFA sistemici portano all'esacerbazione dello stato IR preesistente e favoriscono lo sviluppo di un circolo vizioso metabolico concausa importante delle complicanze

³⁰ Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S. The pancreatic beta-cell in human Type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Mar;16 Suppl 1: S3-6. Epub 2006 Feb 9. Review.

³¹ Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013 Apr;132(4):359-83.

³² Borg J, Klint C, Wierup N, Strom K, Larsson S, Sundler F, Lupi R, Marchetti P, Xu G, Kimmel A, Londos C, Holm C. Perilipin is present in islets of Langerhans and protects against lipotoxicity when overexpressed in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology.* 2009 Jul;150(7):3049-57.

³³ Lupi R, Del Guerra S, Fierabracci V, Marselli L, Novelli M, Patane G, Boggi U, Mosca F, Piro S, Del Prato S, Marchetti P. Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes.* 2002 Feb;51 Suppl 1:S134-7.

³⁴ Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Nov 25;364(1-2):1-27.

³⁵ Weir GC, Marselli L, Marchetti P, Katsuta H, Jung MH, Bonner-Weir S. Towards better understanding of the contributions of overwork and glucotoxicity to the beta-cell inadequacy of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009 Nov;11 Suppl 4:82-90.

³⁶ Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:240-51. Review.

macrovascolari associate alla malattia diabetica. Sullo sviluppo dell'IR gravano e incidono sia i fattori ambientali (iperalimentazione e sedentarietà) sia genetici. L'eccessivo introito di nutrienti, associato a una vulnerabilità metabolica individuale, magari geneticamente predeterminata, concorre a determinare un'esagerata deposizione di trigliceridi nel comparto adiposo viscerale e in distretti come il fegato e il muscolo scheletrico che normalmente non sono sede di accumulo lipidico (tesaurismi lipidici). Su questo presupposto si basa la teoria dell'iperafflusso che prevede l'infiltrazione steatosica di vari organi periferici come risultato della saturazione della capacità d'immagazzinare lipidi da parte della cellula adiposa. Alla lipotossicità consegue IR con ridotta captazione del glucosio circolante da parte del muscolo scheletrico, aumentata gluconeogenesi, statosi nel fegato e ateromasi nel distretto cardiovascolare. A livello delle isole di Langerhans, invece, l'accumulo di FFA conduce a una disregolazione del rilascio insulinico che può giungere fino all'esaurimento funzionale della beta cellula e alla perdita anatomica di massa insulare^{37,38,39,40}.

Studi presenti in letteratura hanno dimostrato che, in isole pancreatiche umane esposte per 5 giorni a una concentrazione di glucosio di 300 mg/dl, è stato osservato un tasso di apoptosi significativamente più elevato rispetto a quanto accadeva in presenza di glucosio 100 mg/dl. Un aumento dell'apoptosi, valutato mediante microscopia elettronica, è stato dimostrato anche quando l'esposizione ad alto glucosio (300 mg/dl) era alternata ogni 24 ore con quella

³⁷ Boslem E, Meikle PJ, Biden TJ. Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic β -cell function and dysfunction. *Islets*. 2012 May-Jun;4(3):177-87.

³⁸ Shao S, Yang Y, Yuan G, Zhang M, Yu X. Signaling molecules involved in lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *DNA Cell Biol*. 2013 Feb;32(2):41-9.

³⁹ Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):711-725.

⁴⁰ Gupta D, Krueger CB, Lastra G. Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of β -cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev*. 2012 Mar;8(2):76-83. Review.

a glucosio normale (100 mg/dl)^{41,42,43}. È verosimile che molti degli effetti delle elevate concentrazioni di glucosio siano mediati dalla produzione di radicali liberi dell'ossigeno, prodotti sia attraverso il metabolismo mitocondriale (in accordo con l'evidenza secondo cui i mitocondri di beta-cellule preesposte ad alto glucosio presentano evidenti alterazioni morfologiche) sia attraverso altre vie, tra cui di particolare importanza sembra essere quella delle esosamine⁴⁴. Tutto questo porta a un aumento dello stress ossidativo, così come dimostrato in isole di Langerhans di soggetti non diabetici coltivate in presenza di alto glucosio e anche in isole ottenute da pazienti con diabete di tipo 2^{45,46,47,48}.

Alcuni studi condotti con isole pancreatiche umane hanno aiutato a comprendere come e attraverso quali meccanismi la lipotossicità danneggia le beta-cellule. L'esposizione delle isole umane per 48 ore a un'elevata concentrazione di acidi grassi liberi (FFA) è risultata, in effetti, in grado di aumentare di varie volte il tasso di apoptosi beta-cellulare^{49,50}. Tale risultato

⁴¹ Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S. The pancreatic beta-cell in human Type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Mar;16 Suppl 1:S3-6.

⁴² Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, Bugliani M, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL. Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes.* 2005 Nov;54(11):3238-44.

⁴³ Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Marselli L, Boggi U. The beta-cell in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2010;654:501-14. Review.

⁴⁴ Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2005 Feb;48(2):282-9.

⁴⁵ Novelli M, D'Aleo V, Lupi R, Paolini M, Soleti A, Marchetti P, Masiello P. Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a nonobese mouse diabetes model. *Pancreas.* 2007 Nov;35(4):e10-7.

⁴⁶ Lightfoot YL, Chen J, Mathews CE. Oxidative stress and beta cell dysfunction. *Methods Mol Biol.* 2012;900:347-62. doi: 10.1007/978-1-60761-720-4_17.

⁴⁷ Stadler K. Oxidative stress in diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:272-87. Review.

⁴⁸ Goossens GH. The renin-angiotensin system in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Obes Facts.* 2012;5(4):611-24.

⁴⁹ Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. Cunha DA, Hekerman P, Ladriere L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P, Rutter GA, Eizirik DL, Cnop M. *J Cell Sci.* 2008 Jul 15;121(Pt 14):2308-18.

era completamente prevenuto se si inibivano le caspasi (esecutrici dell'apoptosi), e parzialmente impedito se si bloccava la formazione di ceramide, un prodotto derivante dal metabolismo degli FFA^{51,52}. Inoltre, l'aumentata apoptosi si associava a una diminuzione dell'espressione genica di Bcl₂⁵³, una molecola con proprietà antiapoptotiche. Peraltro, è stato successivamente dimostrato che i vari FFA hanno effetti diversi: sarebbero gli acidi grassi saturi a lunga catena (palmitico e stearico in particolare) a essere dannosi per le beta-cellule, mentre l'acido oleico sembrerebbe addirittura avere un effetto protettivo⁵⁴. Infine, è da sottolineare come alcuni autori ritengano che gli acidi grassi siano tossici per la beta-cellula particolarmente (o forse soltanto) quando associati ad alte concentrazioni di glucosio (condizione definita di gluco-lipotossicità)^{55,56}.

⁵⁰ Cnop M, Ladriere L, Igoillo-Esteve M, Moura RF, Cunha DA. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β -cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. 85 2010 Oct;12 Suppl 2:76-82. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01279.x. Review.

⁵¹ Boslem E, Meikle PJ, Biden TJ. Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic β -cell function and dysfunction. *Islets*. 2012 May-Jun;4(3):177-87. doi: 10.4161/isl.20102. Review.

⁵² Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*. 2006 Jan;45(1):42-72.

⁵³ Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, Biden TJ. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007 Apr;50(4):752-63

⁵⁴ Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P. 84 Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*. 2002 May;51 (5):1437-42.

⁵⁵ Baldwin AC, Green CD, Olson LK, Moxley MA, Corbett JA. A role for aberrant protein palmitoylation in FFA-induced ER stress and β -cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jun 1;302(11):E1390-8.

⁵⁶ Las G, Serada SB, Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J Biol Chem*. 2011 Dec 9;286(49):42534-44. Epub 2011 Aug 21.

2.7 *Ruolo delle incretine*

Alcuni ormoni peptidici secreti dall'intestino stimolano la secrezione d'insulina in risposta ai pasti, e vengono per questo detti "incretine"⁵⁷.

Nell'ambito della terapia del diabete di tipo 2 vi sono alcune problematiche al momento sostanzialmente irrisolte: la prima deriva dall'evidenza che la storia naturale evolva verso il progressivo peggioramento, indipendentemente dalla terapia che con il tempo diviene progressivamente più complessa. Come già discusso, l'elemento patogenetico responsabile è il progressivo declino della funzione beta-cellulare. Un ulteriore problema è rappresentato dal fatto che, all'infuori della metformina, tutti gli altri trattamenti si associano al progressivo incremento ponderale che a propria volta rappresenta un ulteriore elemento che contribuisce a rendere più difficile il controllo della malattia. In questo contesto, a partire dagli anni trenta del secolo scorso, si sviluppa il concetto di incretina (**I**ntestine **S**ecretion **I**nsulin), che definisce l'insieme di quelle sostanze, successivamente identificate come ormoni, responsabili del fenomeno per cui la risposta della secrezione di insulina a una dose standard di glucosio è significativamente superiore se lo stesso glucosio viene somministrato per via orale rispetto alla via endovenosa^{58,59}. Si è in seguito osservato che questo effetto incretinico dipendeva in larga misura dalla secrezione di due ormoni prodotti nel tratto gastroenterico, entrambi appartenenti alla superfamiglia del glucagone: il GIP (inizialmente definito

⁵⁷ Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev.* 2008 Dec;60(4):470-512. doi: 10.1124/pr.108.000604. Epub 2008 Dec 12. Review

⁵⁸ Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986 Jan;29(1):46-52.

⁵⁹ Nauck MA, El-Ouaghli A, Gabrys B, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Gallwitz B, Schmidt WE, Meier JJ. Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept.* 2004 Nov 15;122(3):209-17.

gastric inhibitory polypeptide, in seguito corretto in glucose-dependent insulinotropic polypeptide), polipeptide di 42 aminoacidi prodotto dalle cellule K del duodeno e digiuno prossimale identificato nel 1970 (Fig. 4), e il GLP-1 (glucagon-like peptide-1), peptide di 30/31 aminoacidi prodotto dalle cellule L dell'ileo e colon identificato nel 1983^{60,61,62,63} (Fig 5). GIP e GLP-1 sono simili in quanto vengono entrambi stimolati dall'ingestione di cibo, rapidamente metabolizzati (emivita di 1-2 minuti) dall'enzima DPP-IV (dipeptidil peptidasi-IV) ed entrambi stimolano la secrezione di insulina in risposta al glucosio. Un ulteriore elemento di distinzione tra i due ormoni riguarda la secrezione nel diabete di tipo 2, ridotta per il GLP-1⁵⁵, inalterata per il GIP.



⁶⁰ Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol*. 2003 Feb;17(2):161-71. Review.

⁶¹ Zarrinpar A, Loomba R. Review article: the emerging interplay among the gastrointestinal tract, bile acids and incretins in the pathogenesis of diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 Nov;36(10):909-21. doi: 10.1111/apt.12084. Epub 2012 Oct 11. Review.

⁶² Deacon CF, Ahrén B. Physiology of incretins in health and disease. *Rev Diabet Stud*. 2011 Fall;8(3):293-306. doi: 10.1900/RDS.2011.8.293. Epub 2011 Nov 10. Review.

⁶³ Kazafeos K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93 Suppl 1:S32-6. doi: 10.1016/S0168-8227(11)70011-0. Review.

Figura 4. Struttura chimica del Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP).
Fonte: www.123rf.com



Figura 5. Struttura chimica del Glucacon-like peptide 1 (GLP-1).
Fonte: www.123rf.com

Il proglucagone è la molecola progenitrice del GLP-1 e due sono le forme molecolari equipollenti: GLP-1 e GLP-1 amide. Il proglucagone è scisso nelle cellule L del tratto gastrointestinale e nei neuroni dell'ipotalamo. Il GLP-1 svolge un'azione diretta sulla beta-cellula pancreatica con stimolo della proliferazione e neogenesi dalle cellule duttali e riduzione dell'apoptosi con un effetto complessivo di crescita della massa beta-cellulare⁶⁴. Con l'identificazione del GLP-1 nei primi anni Ottanta e la progressiva dimostrazione dei suoi effetti metabolici e il suo impiego terapeutico per la cura del diabete mellito tipo 2 è andato progressivamente aumentando^{65,66,67}.

⁶⁴ Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R: Endocrinology 143, 4397-4408, 2002; Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R. Endocrinology 144, 5149-5158, 2003

⁶⁵ Brunton SA. Integrating incretin-based therapy into type 2 diabetes management. J Fam Pract. 2013 Jun;62(6 Suppl CME):S1-8.

⁶⁶ Umpierrez GE, Korytkowski M. Is Incretin-Based Therapy Ready for the Care of Hospitalized Patients With Type 2 Diabetes?: Insulin therapy has proven itself and is considered the mainstay of treatment. Diabetes Care. 2013 Jul;36(7):2112-7.

Negli anni si sono esplorate diverse possibilità terapeutiche alternative all'infusione del GLP-1, ma tutte incentrate sul principio di riprodurre o potenziarne l'azione: alcuni composti generati da queste ricerche sono approdati alla pratica clinica, mentre altri sono in fase avanzata di sperimentazione⁶⁸. Complessivamente, sono tre i gruppi di sostanze, oltre allo stesso GLP-1, che hanno un effetto incretinomimetico: ormoni naturali simil-GLP-1 (Exendin-4, Exenatide)^{69,70}, analoghi sintetici del GLP-1 (Liraglutide)^{71,72} e inibitori dell'enzima DPP-IV (Vildagliptin, Sitagliptin, Linagliptin)^{73,74,75,76}. L'Exendin-4 è un peptide naturale di 39 aminoacidi inizialmente identificato come prodotto della saliva e successivamente come ormone stimolato dall'assunzione di cibo nel Gila Monster, un rettile che vive nel deserto dell'Arizona. L'Exendin-4 è codificato da un gene distinto da quello del GLP-1, ma rispetto al GLP-1 umano mostra un'omologia di

⁶⁷ Gale E. Incretin therapy: should adverse consequences have been anticipated? *BMJ*. 2013 Jun 10;346:f3617.

⁶⁸ Gupta V. Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013 May;17(3):413-21.

⁶⁹ Egecioglu E, Engel JA, Jerlhag E. The glucagon-like Peptide 1 analogue, exendin-4, attenuates the rewarding properties of psychostimulant drugs in mice. *PLoS One*. 2013 Jul 16;8(7):e69010.

⁷⁰ Petersen AB, Christensen M. Clinical potential of lixisenatide once daily treatment for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2013 Jun 17;6:217-31.

⁷¹ Baruah MP, Chaudhury T, Sethi BK, Dharmalingam M. Liraglutide in type 2 diabetes mellitus. *J Indian Med Assoc*. 2012 May;110(5):335-8. Review.

⁷² Shyangdan D, Cummins E, Royle P, Waugh N. Liraglutide for the treatment of type 2 diabetes. *Health Technol Assess*. 2011 May;15 Suppl 1:77-86.

⁷³ Lankas GR, Leiting B, Roy RS, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type-2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. *Diabetes* 2005;54:2988-2994.

⁷⁴ Charbonnel B, Schweizer A, Dejager S. Combination therapy with DPP-4 inhibitors and insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: what is the evidence? *Hosp Pract* (1995). 2013 Apr;41(2):93-107.

⁷⁵ Brown DX, Choudhury M, Evans M. Linagliptin as add-on therapy for type 2 diabetes - an overview. *Drugs Today (Barc)*. 2012 Oct;48(10):645-54.

⁷⁶ Guerci B, Monnier L, Serusclat P, Petit C, Valensi P, Huet D, Raccach D, Colette C, Quéré S, Dejager S. Continuous glucose profiles with vildagliptin versus sitagliptin in add-on to metformin: results from the randomized Optima study. *Diabetes Metab*. 2012 Oct;38(4):359-66.

sequenza del 52% e una pressoché sovrapponibile affinità di legame per il recettore del GLP-1 umano^{77,78}. La forma sintetica dell'exendin-4, denominata exenatide, rappresenta il composto maggiormente investigato tra tutti gli incretino-mimetici e il solo, al momento, approvato dalla FDA. L'exenatide ha una struttura identica alla molecola nativa exendin-4, mostra un'affinità di legame al recettore del GLP-1 identica al GLP-1 umano, viene rapidamente assorbita dopo iniezione sotto cutanea e risulta resistente all'azione del DPP-IV. L'efficacia di exenatide come trattamento nel diabete di tipo 2 è stata dimostrata da numerosi studi clinici^{66,67,79}. L'analogo sintetico più conosciuto del GLP-1 è la liraglutide: ottenuto come molecola ricombinante acilata, rispetto alla sequenza originale del GLP-1 umano presenta una sostituzione (arginina al posto di lisina) in posizione 34 e l'aggiunta di un acido grasso a 16 atomi di carbonio (acido palmitico) ancorato a mezzo di un residuo di glutammato legato a propria volta a una lisina in posizione 26. L'acilazione e la diversa sequenza della molecola ne modificano la farmacocinetica determinandone un più lento assorbimento dal deposito sottocutaneo, una più lunga emivita per il legame che per mezzo dell'acido grasso s'instaura con l'albumina circolante e una più lenta degradazione da parte del DPP-IV^{68,69}. Un approccio differente rispetto agli analoghi del GLP-1, ma con un simile razionale incretino-mimetico, è quello che si basa sull'impiego di farmaci inibitori dell'enzima DPP-IV mirato a potenziare l'azione di GIP e GLP-1

⁷⁷ Kang HM, Kang Y, Chun HJ, Jeong JW, Park C. Evaluation of the in vitro and in vivo angiogenic effects of exendin-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 26;434(1):150-4.

⁷⁸ Gupta NA, Kolachala VL, Jiang R, Abramowsky C, Romero R, Fifadara N, Anania F, Knechtle S, Kirk A. The glucagon-like peptide-1 receptor agonist Exendin 4 has a protective role in ischemic injury of lean and steatotic liver by inhibiting cell death and stimulating lipolysis. *Am J Pathol*. 2012 Nov;181(5):1693-701.

⁷⁹ DeFronzo RA, Ratner RE, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. *Diabetes Care* 28, 1092-1100, 2005; Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. *Diabetes Care* 27: 2628-2635, 2004; Kendall DM, Riddle MC, Rosenstock J, Zhuang D, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. *Diabetes Care* 28, 1083-1091, 2005

endogeni. L'inibizione dell'attività del DPP-IV determina, infatti, un aumento delle concentrazioni circolanti di questi due ormoni con conseguente stimolazione della secrezione insulinica, inibizione di quella del glucagone e rallentamento dello svuotamento gastrico⁷⁰⁻⁷³. Poiché l'aumento dell'insulina indotto da GLP-1 e GIP e l'inibizione della secrezione di glucagone indotta da GLP-1 cessa quando la glicemia ritorna ai livelli normali, l'incidenza di ipoglicemia in corso di trattamento con questa categoria di farmaci dovrebbe, almeno in teoria, risultare bassa. Diverse molecole con attività di inibizione del DPP-IV e somministrabili per via orale vengono utilizzate nella pratica clinica del diabete mellito tipo 2 (vildagliptin, sitagliptin e BMS-477118)⁸⁰. Gli incretino-mimetici rappresentano una nuova classe farmacologica di estremo interesse per la terapia del diabete mellito tipo 2. Questi farmaci risultano estremamente efficaci e dotati, con ogni probabilità, di potenzialità molto più estese di quanto non sia apparso finora.

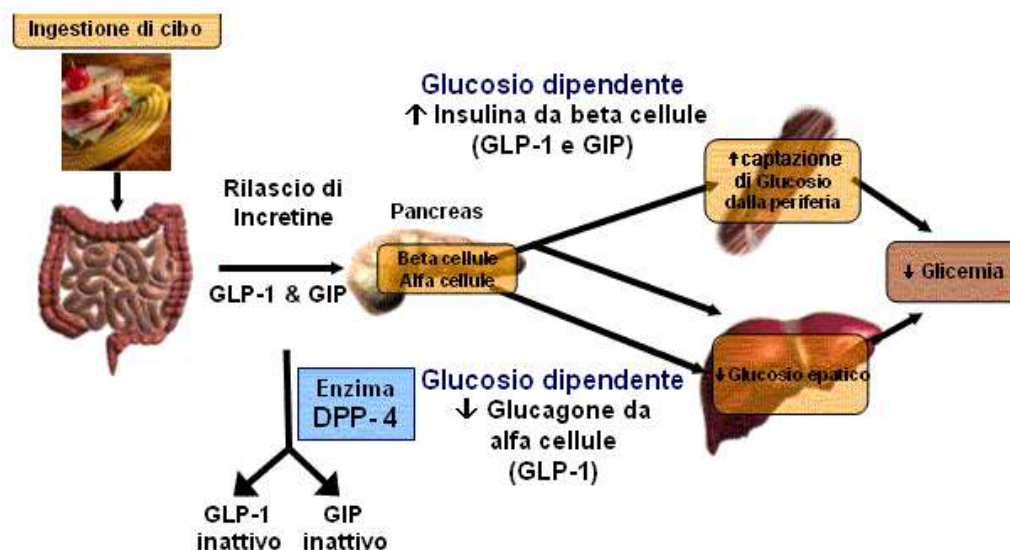


Figura 6A. Azioni delle incretine nell'omeostasi glucidica.

Fonte: <http://www.pillole.org>

⁸⁰ Augeri DJ, Robl JA, Betebenner DA, Magnin DR, Khanna A, Robertson JG, Wang A, Simpkins LM, ete al. J Med Chem 48, 5025-5037, 2005

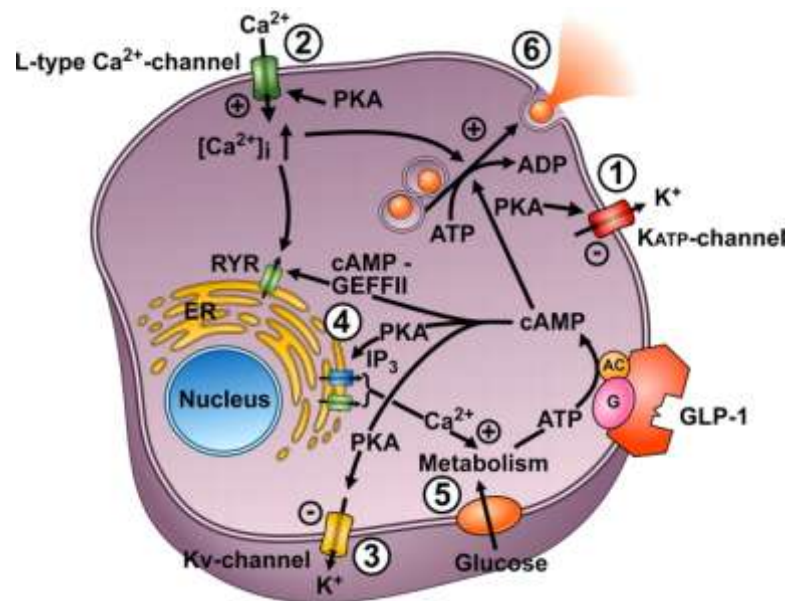


Figura 6B. Meccanismi beta-cellulari di induzione della secrezione insulinica da parte del GLP-1.

Fonte: physrev.physiology.org

Capitolo 3. *Scopo della tesi*

Poiché in letteratura sono pochi o assenti gli studi riguardanti la produzione e la funzione di GLP-1 prodotto a livello delle alfa cellule pancreatiche, lo scopo della mia tesi è stato quello di valutarne sia la secrezione in una linea cellulare di alfa cellule murine che il ruolo che questa incretina potrebbe esercitare sulle stesse cellule esposte o meno a perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito tipo 2.

Capitolo 4. *Materiali e Metodi*

4.1 *Linea cellulare alfa -TC1 e condizioni di coltura*

La linea cellulare utilizzata, alphaTC1 (clone 6) è una linea di alfa cellule pancreatiche clonate da una linea di alphaTC1, derivate da un adenoma indotto su topi trans-genici infettati con virus SV40 sotto il controllo del promotore del gene del pro-glucagone di ratto. Anche se la linea cellulare a-TC1 produce glucagone e notevoli quantità d'insulina e di mRNA pre-proinsulina, la linea clonale (clone 6) é altamente differenziata e produce glucagone ma non insulina o mRNA pre-proinsulina^{81,82}.

4.2 *Coltura cellulare*

Le cellule sono state scongelate in acqua a 37° C e in seguito il vials è stato sterilizzato in etanolo al 70%. Sotto cappa da un volume precedente di 1 mL preleviamo 0.5 mL e inseriamo, in fiasca da 75 mL, 15 mL di DMEM al 10% FBS (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e glucosio 11.1 mmol/l. A tre, a cinque e a sette giorni è cambiato il terreno di coltura, così che al giorno dieci le cellule sono al 50% di confluenza. Al dodicesimo giorno sono al 75% e vengono tripsinizzate in quattro piastre, di cui tre vengono surgelate in azoto per uso futuro e una viene utilizzata per la crescita cellulare, ripetendo il procedimento per tre volte. In tutti gli esperimenti 24 h prima le cellule vengono private di FBS e il glucosio viene ridotto a 1 g/l. L'esperimento di time course inizia incubando le cellule in terreno contenete DMEM 0% e

⁸¹ Chen X, Hermansen K, Xiao J, Bystrup SK, O'Driscoll L, Jeppesen PB. Isosteviol has beneficial effects on palmitate-induced α -cell dysfunction and gene expression. PLoS One. 2012;7(3):e34361.

⁸² Shen XX, Li HL, Pan L, Hong J, Xiao J, Hermansen K, Jeppesen PB, Li GW. Glucotoxicity and α cell dysfunction: involvement of the PI3K/Akt pathway in glucose-induced insulin resistance in rat islets and clonal α TC1-6 cells. Endocr Res. 2012;37(1):12-24.

glucosio 5.5 mmol/l (0 h), e per 4, 8, 16, 24, 120 h in presenza di glucosio 16.7 mmol/l

Negli esperimenti in presenza di acidi grassi si hanno quattro differenti terreni di coltura. Le cellule si incubano per 16 h in presenza o assenza di acidi grassi liberi (oleico-palmitico 2:1) alla concentrazione di 0.5 mM e due concentrazioni di glucosio : basso. 5.5 mmol/L e alto: 16.7 mmol/L

In tutte le condizioni sperimentali nel terreno di coltura è stato aggiunto un inibitore della Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4), Ile-Pro-Ile, alla concentrazione di 10 μ M

4.3 *Attività metabolica*

Principio del test. Il saggio citosolico MTT serve a valutare la diminuzione o l'incremento di vitalità delle cellule servendosi di un agente ossidante cromogeno, (MTT bromide) corrispondente a un sistema policiclico ($C_{18}H_{16}BRN_5S$) dotato di un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico, formando per apertura dell'anello tetrazolico un composto cromogeno azotato detto formazano, il cui gruppo funzionale caratteristico è $R_1NH-N=CR_2-N=RN_3$. Il formazano forma dei cristalli insolubili nell'ambiente intracellulare cui le membrane sono sostanzialmente impermeabili: è quindi permessa l'entrata della molecola nella cellula, ma non l'uscita del prodotto se questo è stato correttamente metabolizzato, cioè se le catene di trasporto elettronico sono ancora metabolicamente attive (vale a dire dotate di un attivo potere riducente). La trasformazione dell'MTT vede un viraggio della molecola da giallo a blu scuro-violetto, pertanto un saggio colorimetrico (ad esempio una lettura allo spettrofotometro) servirà per stimare il numero di mitocondri attivi e quindi il numero di cellule vitali nel campione.

Quantità di MTT bromide valutata per 50000 cell/pozzetto (piastra da 96 pozzetti): 100µg/100µl. Tempo necessario perché si verifichi la reazione colorimetrica: 2 ore^{83,84}. Successivamente è stata misurata l'assorbanza a 540 nm e corretta a 620 nm

4.4 *Vitalità cellulare*

Principio del test. La vitalità cellulare è stata misurata tramite l'utilizzo di sonde fluorescenti. I coloranti utilizzati sono stati lo ioduro di propidio (PI, λeccitazione = 536, λemissione = 617. Rosso) e la fluoresceina di-acetato (FDA, λeccitazione = 492, λemissione = 518. Verde). Il primo è un indicatore del numero di cellule morte, poiché può penetrare attraverso la membrana danneggiata delle cellule morte e legarsi alle basi azotate presenti nel nucleo, ma non è in grado di attraversare la membrana integra delle cellule vitali. Il secondo colorante è un indicatore del numero di cellule vive: una volta all'interno della cellula è idrolizzato, tramite un enzima, a 5-carbossifluoresceina, la quale non riesce ad attraversare le membrane integre e quindi non è più capace di uscire dalle cellule vitali, mentre passa facilmente le membrane lese delle cellule morte.

Metodica. Al termine dei giorni d'incubazione le alfa cellule sono state tripsinizzate, centrifugate e poste in 20 ml di DMEM 10% FBS. Successivamente sono stati aggiunti ioduro di propidio alla concentrazione 750 µmol/l (Calbiochem, CA, USA), fluoresceina di-acetato alla concentrazione 24

⁸³ Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electrontransport in MTT reduction. Arch. Biochem. Biophys. 303, 474-482.

⁸⁴ Liu Y, Schubert D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. J Neurochem. 1997 Dec;69(6):2285-93.

μmol/l (Calbiochem, CA, USA) e le cellule sono state poste in agitazione continua per 45 minuti a 37°C in un incubatore a CO₂ al 5%. Al termine del periodo d'incubazione le cellule sono state centrifugate a 100g per 1 minuto, scartato il surnatante, lavato il pellet con 500 μl di acqua sterile (per eliminare tutto il colorante in eccesso), centrifugato di nuovo a 100g per 1 minuto, scartato di nuovo il surnatante ed infine aggiunti 200 μl di acqua sterile per la lettura finale allo spettrofluorimetro (Cary Eclipse, Varian, Stati Uniti). I valori sono stati espressi come rapporto delle Unità Arbitrarie di Assorbanza (UA) per i valori di FDA/PI [169,170]. Il numero della percentuale di cellule vive è stato ricavato in base al calcolo:

$$\% \text{ cellule vive} = \frac{\text{UA FDA}}{\text{UA FDA} + \text{UA PI}} \times 100$$

4.5 *Valutazione del tasso di apoptosi cellulare*

Principi generali. L'apoptosi è un processo di morte cellulare programmata in cui una sequenza di eventi conduce all'eliminazione delle cellule. Durante il ciclo di vita di un organismo, l'apoptosi svolge un ruolo fondamentale nel normale sviluppo e il mantenimento dell'omeostasi tissutale eliminando le cellule inutili e in cattivo stato vitale. In condizioni patologiche come il diabete, la disregolazione dei meccanismi che regolano l'apoptosi può alterare il processo vitale delle cellule portando a una distruzione totale del tessuto interessato.

Principio del metodo. In questo studio abbiamo utilizzato un kit per il dosaggio dell'Annexina (Annexin V FITC Assay Kit, Caymann), proteina Ca⁺⁺ dipendente con forti proprietà anticoagulanti, in grado di legarsi alla

fosfatidilserina e dare così fluorescenza nel verde grazie al fluoroforo coniugato (FITC, fluoresceina isotiocianato, emissione nel verde). La fosfatidilserina è un fosfolipide che normalmente si trova nel lato interno della membrana cellulare. Durante l'apoptosi, invece, la fosfatidilserina è esposta verso l'esterno e permette all'annexina V di legarsi a essa. Poiché questo legame potrebbe avvenire anche in assenza di apoptosi, in quanto in condizioni di necrosi si ha la rottura della membrana plasmatica e l'annexina può legarsi alla fosfatidilserina anche in assenza di apoptosi. Per questa ragione, al saggio è aggiunto ioduro di propidio (emissione nel rosso), indicatore d'integrità della membrana poiché s'intercala al DNA solo nel caso in cui la membrana non sia integra.

Le cellule che risulteranno negative sia all'annexina che allo ioduro di propidio saranno cellule vive, quelle positive all'annexina e negative allo ioduro di propidio saranno cellule in fase precoce di apoptosi e le cellule negative all'annexina e positive allo ioduro di propidio saranno cellule necrotiche.

Preparazione del tampone di saggio

1. Sospensione del Cell-Based Assay Buffer in 100 ml di H₂O distillata
2. Preparazione della Staining Solution Annexin V FITC/Propidium Iodide addizionando 10 µl di Cell Based Annexin V FITC e 10 µl di Cell-Based Propidium Iodide Solution a 5 ml Assay Binding Buffer diluito mescolando bene e proteggendo dalla luce.

Metodica. Le cellule (50000 cell/pozzetto, piastra da 96) sono state incubate per 16h a 37° C con glucosio 5.5 e 16.7 mmol/L e FFA 0.5 mmol/L. Al termine dell'incubazione la piastra è stata centrifugata e il surnatante aspirato delicatamente. Sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 µl di Assay

Binding Buffer, centrifugati e aspirato il surnatante. Le cellule sono state successivamente incubate con 50 µl di Annexin V FITC/Propidium Iodide Satining per 10 minuti e, al termine dell'incubazione, è stata fatta un'ulteriore centrifugata e scartato il surnatante. Tutte le centrifugate sono state effettuate a 400 x g per 5 minuti. Infine sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 µl del tampone di saggio. La lettura è stata effettuata con lettore a fluorescenza per multiwell (Cary Eclipse, Varian), con lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione di 560/595 nm per lo ioduro di propidio (emissione nel rosso, necrosi), e 485/535 nm per la fluorescina diacetato (emissione nel verde, apoptosi)^{85,86,87}.

4.6 Immunofluorescenza

Principio del metodo. L'analisi d'immunofluorescenza è stata effettuata mediante microscopio a fluorescenza per evidenziare la presenza del recettore per il GLP-1 sulle alfa cellule murine. L'immunofluorescenza⁸⁸ è una delle tecniche più usate in biologia cellulare o nei laboratori biomedici, per rilevare in un certo campione la presenza di specifici antigeni, utilizzando anticorpi legati a traccianti fluorescenti. Gli anticorpi sono in grado di legarsi alle strutture cellulari in modo molto specifico, consentendo la valutazione

⁸⁵ Watanabe A, Nishijima K, Zhao S, Zhao Y, Tanaka Y, Takemoto H, Strauss HW, Blankenberg FG, Tamaki N, Kuge Y. Quantitative determination of apoptosis of pancreatic β-cells in a murine model of type 1 diabetes mellitus. *J Nucl Med.* 2012 Oct;53(10):1585-91.

⁸⁶ Ou D, Metzger DL, Wang X, Huang J, Pozzilli P, Tingle AJ. TNF-related apoptosis-inducing ligand death pathway-mediated human beta-cell destruction. *Diabetologia.* 2002 Dec;45(12):1678-88.

⁸⁷ Ris F, Hammar E, Bosco D, Pilloud C, Maedler K, Donath MY, Oberholzer J, Zeender E, Morel P, Rouiller D, Halban PA. Impact of integrin-matrix matching and inhibition of apoptosis on the survival of purified human beta-cells in vitro. *Diabetologia.* 2002 Jun;45(6):841-50

qualitativa e quantitativa delle strutture bersaglio attraverso un microscopio a fluorescenza. Esistono due principali tipi d'immunofluorescenza: diretta e indiretta. Nell'immunofluorescenza diretta s'incuba il substrato con un anticorpo primario marcato con un fluorocromo: l'anticorpo riconosce l'antigene e lo lega specificamente. Il nostro studio è stato effettuato con metodica indiretta, dove ad un anticorpo primario non marcato viene legato un secondario portante un fluoroforo. Quando i preparati vengono osservati al microscopio a fluorescenza, vengono eccitati da una radiazione di appropriata lunghezza d'onda ed emettono fluorescenza.

Metodica. 100.000 cellule per pozzetto sono state coltivate in apposite chamber slide LAB-TEK(R) 8 pozzetti su vetro per 24h a 37°C in un incubatore a CO₂ in terreno di coltura DMEM contenente glucosio 11.1 mmol/L, con l'aggiunta di Fetal Bovine Serum (FBS) al 10%. Il giorno successivo, il terreno di coltura è stato cambiato e le cellule coltivate per successive 24h in DMEM senza FBS e con glucosio 5.5 mmol/l e 16.7 mmol/L. Al termine del periodo d'incubazione, le cellule cresciute sui vetrini sono state fissate in formaldeide 4% per 15 minuti a temperatura ambiente, dopodiché è stato eliminato il fissativo e le cellule sono state lavate 3 volte per 5 minuti con PBS. Successivamente, le cellule sono state trattate per 60 minuti a temperatura ambiente con tampone di blocco, costituito da PBS 1x 5% siero di capra normale (Cell Signalling) / 0,3% Triton TM X-100) e acqua. Al termine del periodo d'incubazione, i vetrini sono stati lavati 2 volte per 5 minuti in PBS ed aggiunto overnight a 4° C l'anticorpo primario anti-GLP1-R (Glp-1 Rabbit anti-Human policlonale, LifeSpan LS-B5681/29135), con una diluizione 1:150. Il giorno successivo, dopo lavaggio in PBS (3x5 minuti), le cellule sono state trattate con anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con fluorocromo (FITC emissione in verde, anti-rabbit, SouthernBiotheck 6440-02) diluito 1:600, per 2h, a temperatura ambiente, completamente al buio. Dopo

incubazione con l'anticorpo secondario e successivi lavaggi con PBS è stato aggiunto il medio di montaggio del vetrino che contiene un colorante nucleare, il 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI, Sigma Aldrich) alla concentrazione di 50 ng/ml.

Al termine dell'incubazione con anticorpo secondario, la presenza del recettore per GLP-1 e i nuclei delle cellule sono stati osservati sotto microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 80i^{89,90,91}.

Soluzioni utilizzate per lo studio

1. *Soluzione salina tamponata (PBS)*. 1L di acqua milliQ, 80 gr di cloruro di sodio (NaCl), 2 gr di cloruro di potassio (KCl), 14.4 gr di fosfato di sodio bibasico (Na_2HPO_4) e 2,4 gr di fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4). pH 8.0.
2. *Formaldeide al 16%* in metanolo (Polysciences Inc., cat # 18814), utilizzata fresca, conservata al buio a 4°C, diluita in PBS per l'uso.
3. *Tampone di blocco*. PBS 1X, siero d'asino al 5% (# 5425), Triton™ X-100 allo 0,3%. Per 25 ml, sono stati aggiunti 2,5 ml di PBS 10X, 1.25 ml di siero d'asino e 21.25 ml di acqua milliQ. Sotto agitazione, sono stati aggiunti 75 µl di Triton.

⁸⁹ Gier B, Butler PC, Lai CK, Kirakossian D, DeNicola MM, Yeh MW. Glucagon like peptide-1 receptor expression in the human thyroid gland. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Jan;97(1):121-31. doi: 10.1210/jc.2011-2407.

⁹⁰ Tornehave D, Kristensen P, Rømer J, Knudsen LB, Heller RS. Expression of the GLP-1 receptor in mouse, rat, and human pancreas. J Histochem Cytochem. 2008 Sep;56(9):841-51.

⁹¹ Laviola L, Leonardini A, Melchiorre M, Orlando MR, Pescechiera A, Bortone A, Paparella D, Natalicchio A, Perrini S, Giorgino F. Glucagon-like peptide-1 counteracts oxidative stress-dependent apoptosis of human cardiac progenitor cells by inhibiting the activation of the c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway. Endocrinology. 2012 Dec;153(12):5770-81.

4. *Buffer di diluizione.* Diluizione Buffer (1X PBS / BSA 1% / 0,3% Triton[™] X-100): per preparare 40 ml, aggiungere 4 ml di PBS 10X e 120 μ l Triton[™] X-100 e 0,4 gr di BSA. Portare a volume finale di 40 ml con H₂O e mescolare bene.

4.7 Estrazione dell'RNA totale

Principio di funzionamento. Gli RNA Mini kit garantiscono l'estrazione di RNA totale utilizzando colonnine da centrifuga, che permettono di ottenere RNA intatto e ad alta purezza. Dopo lisi cellulare, una colonnina di filtrazione facilita l'isolamento dell'RNA totale e la rimozione di gran parte del DNA genomico. L'aggiunta di DNasi, per la totale eliminazione del DNA genomico, viene effettuata anche per rimuovere possibili tracce di DNA genomico.

Principio del test. Il kit utilizzato per il nostro studio, il QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, CA, USA), permette l'isolamento dell'RNA in modo semplice e veloce. La membrana QIAamp assicura il recupero di RNA estremamente puro e intatto, garantendone un uso affidabile nel settore delle tecnologie di amplificazione. L'RNA può essere isolato da plasma (trattato con anticoagulanti diversi dall'eparina), siero, linfociti e altri fluidi corporei cell-free. Il carrier-RNA, aggiunto al buffer AVL, migliora il legame dell'RNA alla membrana di silice QIAamp, mentre le condizioni saline ed il pH assicurano che proteine e altri contaminanti, che potrebbero inibire le reazioni enzimatiche a valle, non vengano trattenute sulla colonnina. Eventuali agenti inquinanti residui sono eliminati, in modo efficiente, usando due differenti tamponi di lavaggio, AW1 e AW2, che migliorano significativamente la purezza dell'RNA eluito. Inoltre, l'uso del buffer AVE (acqua RNasi free e sodio azide 0.04%) impedisce la crescita microbica e l'eventuale contaminazione con

RNasi, favorendo allo stesso tempo l'eluizione dell'RNA totale legato alla colonnina.

Metodo. Per l'esecuzione del protocollo sono stati utilizzati materiali e soluzioni RNA-free così da evitare possibili contaminazioni del campione. Il primo passaggio del protocollo è servito a preparare la soluzione di buffer AVL-carrier RNA necessaria per l'estrazione dell'RNA totale da 140 µl di soluzione contenente cellule α TC1/6 ($\approx 2 \times 10^6$ cellule) e ottenuta mediante l'aggiunta al buffer AVL di un volume di carrier RNA-buffer AVE contenente 5,6 µg di carrier. Per prima sono stati trasferiti 140 µl di campione in un'eppendorf contenente 560 µl di buffer AVL-carrier RNA, ciascun campione è stato passato al vortex per almeno 15 secondi e incubato a temperatura ambiente per 10 minuti. Agenti potenzialmente infettivi e RNasi vengono inattivati nel buffer AVL, mentre l'aggiunta del carrier-RNA garantisce l'isolamento di acidi nucleici integri. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati a 6000 xg (8000 rpm) per 30 secondi. Successivamente è stato scartato il surnatante, sono stati aggiunti 560 µl di etanolo freddo (96-100%) e ciascuno campione è stato passato al vortex per 15 secondi. A questo punto 630 µl della soluzione ottenuta è stata trasferita su colonnina e centrifugata a 6000 xg (8000 rpm) per 60 secondi; dopo aver scartato l'eluato, la colonnina è stata inserita in un nuovo tubo da 2 mL e l'intero passaggio è stato ripetuto un'ulteriore volta. Eventuali agenti inquinanti residui sono stati eliminati mediante due successive fasi di lavaggio che hanno previsto tempi e velocità di centrifugazione differenti. Per prima, sono stati aggiunti alla colonnina 500 µl di tampone detergente AW1 e di seguito i campioni sono stati centrifugati a 6000 x g (8000 rpm) per 60 secondi. A questo punto, dopo aver scartato l'eluato, sono stati aggiunti 500 µl di tampone detergente AW2, ciascuna colonnina è stata centrifugata a 15700 xg (13000 rpm) per 4 minuti e trasferita in un'eppendorf da 1,5 mL. Infine sono stati aggiunti 40 µl di buffer

AVE, i campioni sono stati centrifugati a 6000 x g (8000 rpm) per 2 minuti e l'eluato recuperato è stato quantificato allo spettrofotometro (Lambda Bio 20, Perkin Elmer, MA, Usa). Poiché la molecola dell'RNA, pur conservandola a -20°C, si degrada molto rapidamente (2-3 giorni), è necessario precipitare l'RNA totale con 0.1 volumi di Acetato di Sodio 2 M e 2 volumi di Etanolo puro freddo. Questa procedura permette di conservare il campione a -20°C per lunghi periodi di tempo^{92,93,94}.

4.8 Retrotrascrizione dell'RNA messaggero

Principio di funzionamento. La retrotrascrizione produce molecole di DNA complementari a tutti gli mRNA presenti nel campione. La reazione avviene grazie all'enzima *trascrittasi inversa*, che sintetizza una catena di DNA complementare ad uno stampo di mRNA, utilizzando i quattro desossiribonucleotidi trifosfato (dNTP) ed un primer, una breve molecola che si appaia all'estremità 3', necessario per avviare la reazione. Un valido primer per la trascrittasi inversa può essere un oligo dT, poiché l'estremità 3' dell'mRNA è dotata di una coda di poli(A).

Metodica. Il kit di retrotrascrizione da noi utilizzato (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, CA, USA) è composto da una miscela di reazione 5x iScript reaction mix (miscela dei quattro dNTP 25 mM), dall'enzima trascrittasi inversa iScript reverse transcriptase e da H₂O nuclease-free. Per prima è stata preparata una miscela con 4 µl di 5x iScript reaction mix, 1 µl di iScript

⁹²Roussel Y, Wilks M, Harris A, Mein C, Tabaqchali S. Evaluation of DNA extraction methods from mouse stomachs for the quantification of *H. pylori* by real-time PCR. J Microbiol Methods. 2005 Jul;62(1):71-81.

⁹³Moreno LA, Cox KL. Quantification of dsDNA using the Hitachi F-7000 Fluorescence Spectrophotometer and PicoGreen dye. J Vis Exp. 2010 Nov 5;(45). pii: 2465. doi: 10.3791/2465.

⁹⁴Hillar M, Orudiakomo S. Identification of messenger RNA for glutamate dehydrogenase using a spectrophotometric probe. Mol Biol Rep. 1986;11(3):131-5.

reverse transcriptase, 1 µg di RNA totale, portata a volume con H₂O RNase-free. La soluzione è stata poi incubata in un ciclizzatore (GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer, MA, USA) per 5 minuti a 25°C e per 30 minuti a 42°C e l'attività della polimerasi è stata inibita innalzando la temperatura della soluzione a 85°C per 5 minuti.

L'alta temperatura è servita anche per separare le catene di cDNA di nuova sintesi dalle catene di RNA complementari. I campioni sono stati utilizzati subito per la PCR o stoccati a -20°C⁹⁵.

4.9 *PCR Real-Time*

Principi generali. La Reazione a Catena della Polimerasi (PCR-Polymerase Chain Reaction) rappresenta una delle tecniche di biologia molecolare più diffusamente utilizzate nei laboratori di ricerca e di diagnostica. Nata nel 1983 da un'idea di Kary Mullis, per anni è stata disponibile solamente nella sua forma originale che, seppur rivoluzionaria e geniale, consentiva la rapida amplificazione di un segmento di DNA in studio ma non la sua quantificazione. Da alcuni anni è stato possibile superare tale limite grazie all'introduzione di una variante della tecnica di base, oggi nota come Real-Time PCR. Questa tecnica permette di quantificare le molecole di DNA in maniera straordinariamente semplice e precisa a partire da poche molecole di DNA. Questa tecnica basa sulla possibilità di misurare l'accumulo dei prodotti di PCR in tempo reale durante tutti cicli della reazione.

Grazie al suo elevato "range" di quantificazione e all'alto grado di sensibilità, la Real-Time PCR è la tecnica di quantificazione del DNA più usata in medicina molecolare, nelle biotecnologie, microbiologia e diagnostica.

⁹⁵Wojewoda CM, Spahlinger T, Harmon ML, Schnellinger B, Li Q, DeJelo C, Schmotzer C, Zhou L. Comparison of Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test version 2.0 (CAP/CTM v2.0) with other Real-time PCR Assays in HIV-1 Monitoring and Follow-up of Low-level Viral Loads. J Virol Methods. 2012 Oct 22.

Il metodo “Gold standard” utilizzato in Real-Time PCR e il metodo Ct si basa sulla definizione di un livello di fluorescenza soglia scelto dall’operatore in maniera tale da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale. Il valore Ct rappresenta il ciclo frazionario della reazione di amplificazione in cui il segnale della fluorescenza del campione interseca il valore soglia. I metodi più comunemente utilizzati per la quantificazione prevedono l'uso di coloranti fluorescenti che si intercalano nella molecola del DNA a doppio - filamento (Sybr Green) o sonde specifiche rivelatrici di fluorescenza (TaqMan)^{96,97}.

La Real-Time PCR TaqMan utilizza sonde rivelatrici di fluorescenza capaci di accrescere significativamente la specificità di amplificazione. La valutazione quantitativa dell’acido nucleico è quindi affidata alla rivelazione e alla conseguente quantificazione di un "reporter" fluorescente, il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità del prodotto di PCR presente. A tal proposito viene disegnata una sonda gene-specifica, generalmente lunga 20-30 paia di basi, capace di appaiarsi all’interno della sequenza riconosciuta dalla coppia di primer utilizzata. Tale sonda contiene due fluorocromi: FAM (6-carboxy-fluorescein) o VIC come *reporter* fluorescente legato covalentemente all’estremità 5’ e TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) come *quencher* fluorescente legato covalentemente all’estremità 3’, capace di assorbire nello spettro di emissione del reporter. Finché la sonda è integra, la vicinanza tra quencher e reporter annulla l'emissione del segnale di fluorescenza.

Replicando lo stampo, la Taq DNA polimerasi incontra la sonda e comincia a degradarla grazie alla sua attività 5'-esonucleasica.

⁹⁶ Kierat S, Leś K, Przybylski M, Dzieciatkowski T, Młynarczyk G. [TaqMan fluorescent probe-based real-time PCR assay for detection of varicella-zoster virus]. Med Dosw Mikrobiol. 2012;64(2):139-49.

⁹⁷ Jensen EC. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction to measure mRNA: use, limitations, and presentation of results. Anat Rec (Hoboken). 2012 Jan;295(1):1-3.

L'allontanamento del reporter dal quencher pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa sì che il reporter inizi a emettere fluorescenza. L'incremento di fluorescenza osservato è proporzionale alla quantità di prodotto di PCR presente. La possibilità di utilizzare vari tipi di fluorocromi per marcare sonde diverse consente di rilevare contemporaneamente più di una sequenza target in una sola reazione, realizzando così una reazione in multiplex^{98,99,100}. Il Sybr Green invece è una molecola fluorescente che si lega, in modo aspecifico, al solco minore del DNA a doppio filamento (dsDNA). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu a una lunghezza d'onda max di 488 nm ed emette luce verde a una lunghezza d'onda maggiore ($\lambda_{max} = 522$ nm). All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primer e molecole fluorescenti Sybr Green. Dopo l'annealing dei primer, solo poche molecole di Sybr Green si legano al dsDNA e iniziano a emettere fluorescenza. Durante la fase di sintesi gli ampliconi prodotti generano un segnale molto intenso e l'incremento di fluorescenza emessa è proporzionale al numero di molecole di fluoroforo intercalate nel dsDNA^{101,102,103}.

⁹⁸Monjezi R, Tan SW, Tey BT, Sieo CC, Tan WS. Detection of hepatitis B virus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR. *J Virol Methods*. 2012 Sep 27.

⁹⁹Ish-Shalom S, Lichter A. Analysis of fungal gene expression by Real Time quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2010;638:103-14.

¹⁰⁰Donia D, Petrinca AR, Divizia M. A strategy to increase the specificity of Syber Green I qRT-PCR in hepatitis A detection. *New Microbiol*. 2010 Jul;33(3):215-22.

¹⁰¹Bakshi D, Singhal P, Mahajan SK, Subramaniam P, Tuteja U, Batra HV. Development of a real-time PCR assay for the diagnosis of scrub typhus cases in India and evidence of the prevalence of new genotype of *O. tsutsugamushi*. *Acta Trop*. 2007 Oct;104(1):63-71.

¹⁰²Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009 Feb;37(3):e21

¹⁰³Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 15;30(10):e47)

4.10 *Analisi della curva di melting*

Poiché questo sistema è basato sull'utilizzo della molecola Sybr Green I è stato necessario procedere con l'analisi della curva di melting, capace di fornire un'indicazione sulla purezza dell'amplificato e sulla presenza di eventuali dimeri di primer. Al termine della reazione di PCR la temperatura viene gradualmente aumentata da 65°C, condizione in cui tutto il DNA è a doppia elica e la fluorescenza è massima, a 90° C, temperatura alla quale tutto il DNA è presente in forma dissociata e la fluorescenza è minima. Questo lento incremento della temperatura induce un decremento della fluorescenza e la temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento del segnale fluorescente corrisponde alla temperatura di melting del prodotto amplificato, ovvero la temperatura alla quale il 50% del DNA è in forma di singolo filamento (ssDNA). Osservando una curva di melting è possibile notare un flesso in corrispondenza di ciascuna specifica T_m . Naturalmente se si distinguono più flessi di fluorescenza, è logico desumere che nella reazione di PCR siano stati prodotti amplificati aspecifici. I flessi di fluorescenza, per comodità di interpretazione, sono trasformati in picchi eseguendo la derivata prima della curva (Figura 7B).

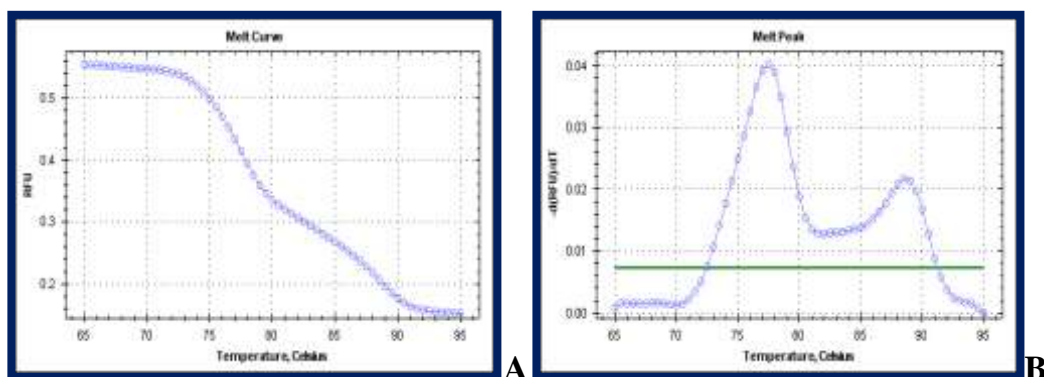


Figura 7. Esempio di curva di melting (A) e derivata negativa (B) specifica per gli ampliconi dei telomeri e dell'albumina.

4.11 Valutazione dell'espressione genica di PC1/3, PC2 e Beta-Actina (BA) mediante Real-Time RT-PCR con Syber Green

Preparazione dei campioni

Per ogni punto sperimentale è stata preparata una miscela di reazione contenente 10 µl di SYBR GREEN (composta da desossiribonucleotidi trifosfato, Taq DNA polimerasi e molecola Sybr Green I) (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK), 8 µl di H₂O RNase-free, 1 µl di ciascun oligo specifico. Successivamente, in ogni pozzetto di una piastra da 48 posti per lettura in fluorescenza (MultiplateR PCR PlatesTM, Bio-Rad, CA, USA), sono stati aggiunti 19 µl della miscela preparata e 1 µl di retrotrascritto (20 ng di cDNA)^{104,105,106}.

Il protocollo utilizzato (Fig 8-9), prevede 60 cicli di amplificazione composti da 3 minuti a 95°C (fase di denaturazione), 10 secondi a 95°C (fase di annealing) e 30 secondi a 60°C (fase di sintesi). Le sonde utilizzate, riportate nella tabella sottostante, sono state acquistate dalla ditta Applied Biosystem (**Tabella 1**).

¹⁰⁴ Mauroy A, Poel WH, Honing RH, Thys C, Thiry E. Development and application of a SYBR green RT-PCR for first line screening and quantification of porcine sapovirus infection. BMC Vet Res. 2012 Oct 17;8(1):193.

¹⁰⁵ Chai Z, Ma W, Fu F, Lang Y, Wang W, Tong G, Liu Q, Cai X, Li X. A SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for simple and rapid detection and differentiation of highly pathogenic and classical type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus circulating in China. Arch Virol. 2012 Oct 16.

¹⁰⁶ Rajtak U, Leonard N, Bolton D, Fanning S. A Real-Time Multiplex SYBR Green I Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Screening of Salmonella Serotypes Prevalent in the European Union. Foodborne Pathog Dis. 2011 Mar 7

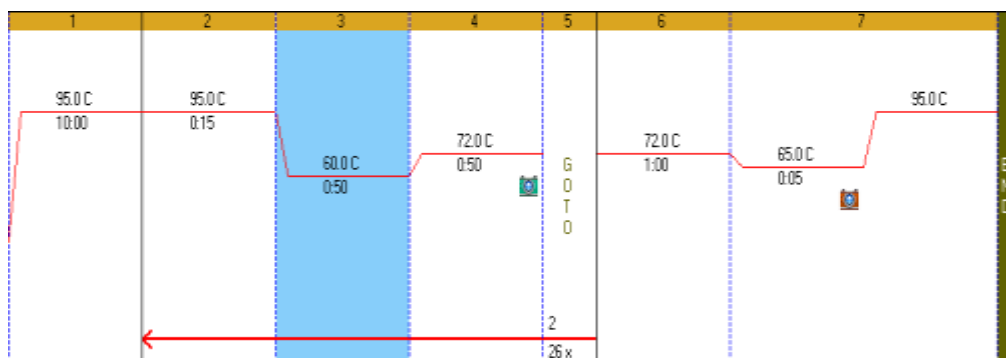


Figura 8. Profilo termico e cicli di amplificazione per la valutazione dell'espressione genica di PC2 e Beta-Actina (BA)

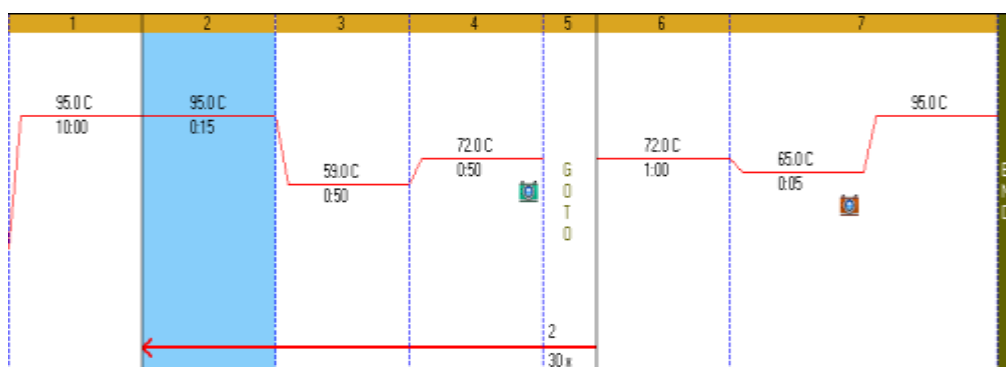


Figura 9. Profilo termico e cicli di amplificazione per la valutazione dell'espressione genica di PC1/3

NOME SONDA	Sequenza 3' ----- 5'
PC1/3 R	CATGGCCTTTGAAGGAGTTCCTTGT
PC1/3 S	ACATGGGGGAGAGAATCCTGTAGGCA
PC2 R	ACTTGTCAAAGCCCACCTTGGAGT
PC2 S	TTGATGCAGGTGCCATGGTGAA
R	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGC
BA BA S	AGCTGCCTGACGGCCAGGTC

Tabella 1. Sequenze oligonucleotidiche utilizzate per lo studio delle alfa-cellule.

4.12 Quantificazione dell'espressione genica con metodica Real-Time RT-PCR TaqMan

Principio di funzionamento. L'analisi dell'espressione genica per la valutazione del messaggero del recettore per il GLP-1 (GLP-1R) e per il gene housekeeping 18s è stata effettuata con metodica Taqman (Applied Biosystem, California, USA) (tabella 2)

Metodica. Per il saggio è stato utilizzato il ciclizzatore *MiniOpticon Real-Time PCR System* (BioRad) e l'analisi è stata effettuata su piastra *Multiplate™ 48-Well Unskirted PCR Plates* (BioRad). Per ogni pozzetto sono stati caricati 10 µl di *SsoFast™ Probes Supermix* (BioRad), con i dNTP e la polimerasi, 1 µl di sonda 20x per il gene studiato, 1 µl di 18s 20x, almeno 20 ng di cDNA del campione e un volume di H₂O RNase free per portare ad un volume finale di 20 µl.

Il saggio viene effettuato in doppio o in triplo. Il protocollo utilizzato (Fig 10), ha previsto una temperatura di denaturazione di 95°C per 3 minuti, quella di annealing di 95°C per 10 secondi, e quella di allungamento di 60°C per 20 secondi, per un totale di 40 cicli. (figura 10)

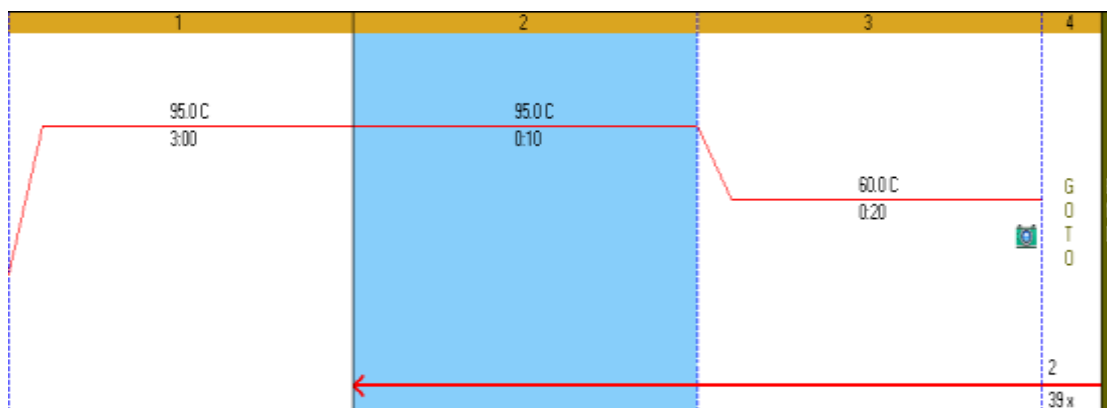


Figura 10. Profilo termico e cicli di amplificazione per la valutazione dell'espressione genica di GLP-1R

Nome Sonda	Codice di riferimento Applied Biosystem
GLP-1R	Applied Biosystem Hm 00445295-gL
Eucariotic 18s + RNA endogenous	Applied Biosystem 4319413 E

Tabella 2. Sonde utilizzate nella metodica Real-Time RT-PCR e codici di riferimento della ditta Life Technologies.

4.13 *Dosaggio proteico con il metodo Bradford*

Principio del test. Il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford è basato sulla misura dell'assorbanza di un reagente affine per le proteine, il Comassie¹⁰⁷ Brilliant Blue. Questo colorante in soluzione acida si lega alle proteine tramite legami elettrostatici fra i propri gruppi sulfonici e la proteina, formando un complesso colorato con una lunghezza d'assorbimento di 595 nm.

Metodica. Per prima cosa è stata preparata una curva di taratura ottenuta diluendo una soluzione standard di albumina a differenti concentrazioni (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml e 0.0625 mg/ml) e sono stati diluiti 1:50 i campioni da dosare. A questo punto è stato aggiunto 1 ml di Comassie Brilliant Blue (reattivo di Bradford) a 20 µl di ciascuno standard, 20 µl di H₂O deionizzata (utilizzata come bianco) e ad un'aliquota di 20 µl di ciascun campione proteico. Infine, i campioni sono stati incubati 5 minuti a temperatura ambiente prima della lettura allo spettrofotometro (Lambda Bio 20, Perkin Elmer, MA, USA) ad una lunghezza d'onda di 595 nm.

¹⁰⁷ Aminian M, Nabatchian F, Vaisi-Raygani A, Torabi M. Anal Biochem. 2013 Mar 15;434(2):287-91. doi: 10.1016/j.ab.2012.11.014. Epub 2012 Dec 3. PMID: 23219565

La concentrazione proteica di ciascuna soluzione è stata estrapolata dalla curva di taratura precedentemente preparata.

4.14 Determinazione della secrezione ormonale: ELISA

4.14.1 GLP-1 Totale

Principio del test. Questo saggio è un Sandwich ELISA basato, in modo sequenziale, su:

1) cattura di molecole di GLP-1 totale da campioni nei pozzetti della micropiastra rivestiti da una quantità pre-titolata di anticorpo anti-GLP-1 policlonale

2) lavaggio dei materiali non legati da campioni

3) legame di un anticorpo anti-GLP-1 monoclonale biotinilato alle molecole catturate

4) lavaggio dei materiali non legati da campioni

5) coniugazione di perossidasi di rafano agli anticorpi biotinilati immobilizzati

6) lavaggio dei coniugati di enzima libero

7) quantificazione degli immobilizzati coniugati anticorpo-enzima, monitorando l'attività di perossidasi di rafano, in presenza del substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina. L'attività enzimatica è misurata spettrofotometricamente a un'assorbanza pari a 450 nm corretti dalla assorbanza a 590 nm, dopo acidificazione dei prodotti formati.

Poiché l'aumento di assorbimento è direttamente proporzionale alla quantità di GLP-1 totale catturato nel campione ignoto, quest'ultimo può essere ricavato per interpolazione da una curva di riferimento generato nello stesso saggio con gli standard di riferimento di concentrazione nota di GLP-1.

Reagenti usati

1. GLP-1 Total piastra ELISA: rivestito con anticorpo pre-titolato GLP-1 umano.
2. 10X HRP Tampone di lavaggio concentrato: concentrato 10X di 50 mM Tris Buffered Saline contenente Tween-20. Diluire 1:10 con acqua distillata o deionizzata.
3. Glp-1 Standard ricostituito con 0,5 ml di acqua distillata o deionizzata.
4. Matrix Solution: matrice di siero elaborato
5. Buffer di saggio: 0.05 M fosfosalino, pH 7.4, contenente sodio azide 0,08% e 1% di BSA.
6. GLP-1 Total Detection Antibody: Soluzione anticorpo pre-titolata in tampone.
7. Soluzione Enzima: streptavidina-perossidasi di rafano pre-titolata coniugata in tampone.
8. Substrato: 3, 3', 5,5'-tetrametilbenzidina in tampone.
9. Soluzione di arresto: 0.3 M HCl

Procedura del test 1. Riempire ogni pozzetto con 300 µl di tampone lavaggio 1x. Decantare il tampone di lavaggio e rimuovere il residuo invertendo la piastra e assorbire velocemente più volte. Lavare la piastra da test utilizzando questa procedura 2 volte. Non lasciate i pozzetti asciutti prima di procedere alla fase successiva.

2. Aggiungere in duplicato 50 µl di Matrix Soluzione al vuoto, controllo qualità e standard
3. Aggiungere in duplicato 50 µl di tampone a ciascuno dei pozzetti del bianco e del campione.
4. Aggiungere in duplicato 50 µl Glp-1 Standard in ordine crescente di concentrazione nei rispettivi pozzetti.

5. Incubare a temperatura ambiente per 1.5 ore su un agitatore circolare per micropiastre e ruotare a velocità moderata, circa 400 a 500 giri al minuto.
6. Decantare il liquido dalla piastra. Asciugare come prima per togliere le soluzioni residue. Lavare i pozzetti 3 volte con Wash Buffer diluito 300 μ l per pozzetto. Decantare e asciugare dopo ogni lavaggio per rimuovere il tampone residuo
7. Aggiungere 100 μ l di Detection Antibody Solution ad ogni pozzetto. Incubare a temperatura ambiente per 1 ora su un agitatore circolare per microtitolazione e ruotare a velocità moderata, circa 400-500 rpm.
8. Decantare il liquido dalla piastra. Asciugare come prima per togliere le soluzioni residue. Lavare i pozzetti per 3 volte con tampone di lavaggio, 300 μ l per pozzetto per lavaggio. Decantare e asciugare dopo ogni lavaggio per rimuovere il tampone residuo.
9. Aggiungere 100 μ l di Enzyme Solution ad ogni pozzetto. Incubare con moderata agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti su agitatore
10. Decantare il liquido dalla piastra e asciugare per rimuovere il liquido residuo. Lavare i pozzetti per 3 volte con tampone di lavaggio diluito, 300 μ l per pozzetto. Decantare e asciugare dopo ogni lavaggio per rimuovere il tampone residuo.
11. Aggiungere 100 μ l di soluzione di substrato in ogni pozzetto, e agitare per circa 20 minuti. Il colore blu dovrebbe essersi formato nei pozzetti del GLP-1 standard con intensità proporzionale alle concentrazioni crescenti di GLP-1 totale.
12. Aggiungere 100 μ l soluzione di arresto e agitare la piastra a mano per garantire la completa miscelazione di soluzioni in tutti i pozzetti. Il colore blu vira al giallo dopo acidificazione. Leggere l'assorbanza a 450 nm e 590 nm in

un lettore di piastre in 5 minuti e assicurarsi che non vi siano bolle d'aria in ogni pozzetto. Registrare la differenza di unità di assorbanza.

4. 14.2 GLP-1 Attivo

Principi della procedura Questo test si basa su:

- 1) La cattura di GLP-1 da campione di un anticorpo monoclonale, immobilizzato nei pozzetti di una micropiastra, che si lega specificamente alla regione N-terminale di molecola GLP-1 attivo
- 2) lavaggio per rimuovere materiali non legati
- 3) Legatura di un rilevamento di fosfatasi GLP-1-alcalino contro coniugato al GLP-1 immobilizzato
- 4) lavare via il coniugato non legato
- 5) quantificazione del coniugato e rilevazione aggiungendo MUP (metil umbelliferil fosfato), che in presenza di fosfatasi alcalina forma il prodotto fluorescente umbelliferone. Poiché la quantità di fluorescenza generata è direttamente proporzionale alla concentrazione di GLP-1attivo nel campione ignoto, quest' ultimo può essere ricavato per interpolazione da una curva di riferimento generato nello stesso saggio con riferimento standard di concentrazioni note di GLP-1 attivo.

Reagenti e soluzioni

A. GLP-1 (attivo) ELISA Piastra

Coniugato con anti-GLP-1 anticorpo monoclonale

B. Tampone di lavaggio concentrato 10X : PBS 10 mM contenente Tween 20 e di sodio azide.

C. GLP-1 (7-36) amide Standards nel tampone del saggio: 2, 5, 10, 20, 50 e 100 pM

D. Assay Buffer: 0.05M PBS, pH 6,8, contenente inibitori di proteasi proprietarie, con Tween 20, 0.08% di sodio azide e 1% di BSA.

Quantità: 25 ml

E. Coniugato Detection Anti GLP-1-fosfato alcalino coniugato.

F. Substrato (Luce sensibile, evitare l'inutile esposizione alla luce)
MUP Quantità: 10 mg

Preparazione: Idratare in 1 ml di acqua deionizzata prima dell'uso.

Utilizzare a 1:200 diluizione in substrato diluente (ad esempio 100 µl di substrato idratato in 20 ml di substrato diluente). Diluire fresco ogni volta dell'uso. Il substrato non diluito può essere usato entro una settimana dopo l'idratazione, se conservato a $\leq -20^{\circ}\text{C}$

G. Diluente per substrato (Light sensibile, evitare un'inutile esposizione alla luce)

H. Stop solution

Procedura del saggio. Il saggio è stato condotto in duplicato in un volume totale 200 µl.

Primo Giorno

1. Si aggiungono 300 µl di tampone lavaggio diluito in ogni pozzetto e si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti. Si decanta e assorbe il tampone in eccesso su carta assorbente.

2. Si aggiungono 200 μ l di Assay Buffer per NSB (legame non specifico) in due pozzetti.
3. Si aggiungono 100 μ l di Assay Buffer ai pozzetti rimanenti.
4. Si aggiungono 100 μ l di standard in ordine crescente nei pozzetti.
5. Si aggiungono 100 μ l dei campioni da determinare nei pozzetti rimanenti. Si agita delicatamente la piastra per una corretta miscelazione.
6. Si copre la piastra con pellicola sigillante. Incubare per una notte (20-24 ore) a 4° C.

Secondo Giorno

7. Si decanta il liquido dalla piastra e si assorbe il liquido in eccesso su carta assorbente.
8. Si lava la piastra 5 volte con 300 μ l di tampone di lavaggio per pozzetto con 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente in soluzione di lavaggio con il quarto lavaggio. Si fa assorbire il tampone in eccesso con carta assorbente dopo il quinto lavaggio.
9. Si aggiungono immediatamente 200 μ l di detection coniugato in ogni pozzetto e si incuba 2 ore a temperatura ambiente.
10. Si lava 3 volte con 300 μ l di tampone lavaggio diluito e si assorbe l'eccesso di tampone con carta assorbente
11. Si aggiunge 200 μ l substrato diluito in ogni pozzetto.

Si incuba almeno 20 minuti a temperatura ambiente al buio. Si monitora per vedere se vi è rapporto significativo tra segnale-rumore con il punto più basso della curva standard (cioè 2 pM), e il punto più alto standard (cioè 100 pM) nel rispetto dell'unità di fluorescenza (RFU).

Se è stato generato sufficiente fluorocromo, aggiungere 50 μ l di soluzione Stop in tutti i pozzetti nello stesso ordine in cui è stato aggiunto il substrato.

Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente al buio per arrestare l'attività di fosfatasi.

12. La piastra si legge su un lettore di piastre a fluorescenza con eccitazione / lunghezza d'onda di emissione di 355 nm/460 nm. **Marca:** Varian **Modello:** Cary Eclipse

4.14.3 Glucagone

Principio del test . Questo test impiega la tecnica sandwich enzima immuno-quantitativa. L'anticorpo monoclonale specifico per glucagone è stato pre-rivestito su una micropiastra. Standard e campioni vengono aggiunti nei pozzetti e il glucagone presente è vincolato all' anticorpo immobilizzato.

Reagenti usati

Calibratore di diluente RD5-59 21 ml di una base proteica.

Buffer di lavaggio: tensioattivo concentrato 10x con soluzione conservante tamponata.

Reagente Colore: perossido d'idrogeno stabilizzato.

Colore Reattivo: cromogeno stabilizzato (tetrametilbenzidina). Soluzione di arresto: acido solforico 2 N.

Procedura del saggio 1. Si lava e si aspira la piastra per un totale di due volte con soluzione di lavaggio prima del dosaggio.

Si lava riempiendo ogni pozzetto con tampone di lavaggio (300 µl). Dopo l'ultimo lavaggio, si rimuove ogni residuo di tampone di lavaggio per aspirazione o decantazione. Si inverte la piastra e si asciuga con fogli di carta puliti.

2. Si aggiungono 150 µl di Diluente del test RD1-110 ad ogni pozzetto.

3. Si aggiungono 50 μ l di standard, controllo o campione per pozzetto. Si copre con il nastro adesivo fornito.

Si incuba per 3 ore a temperatura ambiente.

4. Si aspira ogni pozzetto e si lava come indicato al punto 1, ripetendo il processo per tre volte per un totale di quattro lavaggi.

5. Si aggiungono 200 μ l di glucagone coniugato freddo in ciascun pozzetto e si incuba per 1 ora a 2-8° C.

6. Si lava ogni pozzetto 3 volte.

7. Si aggiungono 200 μ l di soluzione di substrato in ogni pozzetto. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente

8. Si aggiungono 50 μ l di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Il colore dei pozzetti dovrebbe cambiare da blu a giallo.

9. Si determina la densità ottica di ogni pozzetto entro 30 minuti, utilizzando un lettore di micro piastre impostato a 450 nm.

4.15 Analisi Statistica

L'analisi statistica sull'intera popolazione studiata è stata condotta con il modello di regressione lineare semplice. Sui singoli gruppi di studio è stata, invece, applicata la correlazione multipla, il test t di Student per dati indipendenti e l'ANOVA con correzione del Bonferroni.

Il test t permette di verificare se due variabili hanno medie, varianze o distribuzioni sovrapponibili e viene utilizzato per constatare se, la differenza presente tra il valore medio di una medesima misura, rilevata in due popolazioni differenti, sia dovuta o meno al caso. Il test ANOVA è invece utilizzato per confrontare due o più gruppi di dati, confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi. Si ricorre a questo test quando si vuole verificare se, la variabilità delle medie dei valori riscontrati in una popolazione sottoposta a diversi trattamenti, sia dovuta o meno al caso.

Capitolo 5. Risultati

5.0 Studio del GLP-1 in alfa-cellule pancreatiche murine (α -TC1clone 6) esposte ad alto glucosio.

5.1 Caratteristiche linea cellulare studiata

La linea cellulare studiata è costituita da cellule pancreatiche murine clonate da alfa cellule TC1 (α -TC1clone 6), derivanti da adenoma indotto in topo transgenico che esprime l'antigene oncogene T largo SV40, sotto il controllo del promotore del pre-proglucagone di ratto. La linea cellulare parentale da cui derivano è meno differenziata e produce sia il glucagone che l'insulina, mentre la linea che da origine alle alfa cellule TC1 clone 6 è più differenziata e produce solo glucagone¹⁰⁸

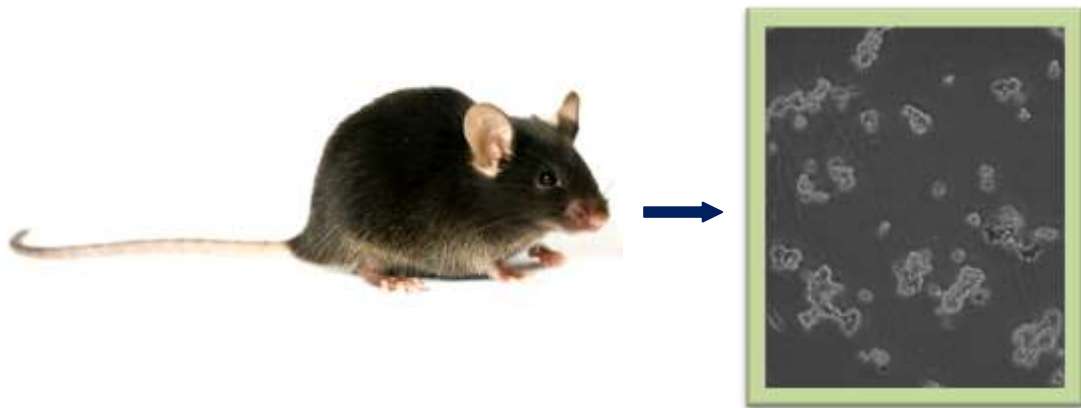


Figura 11. Cellule pancreatiche murine clonate da TC1 (α -TC1clone 6).

¹⁰⁸ Hamaguchi K, Leiter EH. Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines. Viability, secretory function, and MHC antigen expression. Diabetes 39: 415-425, 1990

5.2 Attività metabolica e vitalità cellulare

Al termine del periodo di incubazione, sulle cellule esposte a glucosio 5.5, 11.1, 16.7 e 22.2 mmol/l è stata valutata l'attività metabolica cellulare attraverso il test con MTT¹⁰⁹ e la vitalità tramite l'utilizzo di sonde fluorescenti. Come riportato in **Figura 12**, in tutte le condizioni sperimentali l'attività metabolica delle cellule era significativamente maggiore rispetto ai propri controlli (*= $p < 0.05$ o meno vs glucosio 5.5 mmol/l. Test-t di Student). A differenza della beta-cellula, le alfa-cellule sembrano essere più resistenti alle perturbazioni metaboliche, in particolare agli effetti tossici legati ad una prolungata esposizione ad elevate concentrazioni di glucosio (**Figura 12**) (*= $p < 0.05$ o meno vs glucosio 5.5 mmol/l 24h. Test-t di Student; #= $p < 0.05$ o meno vs glucosio 24h; §= $p < 0.05$ o meno vs glucosio 5.5 mmol/l 120h).

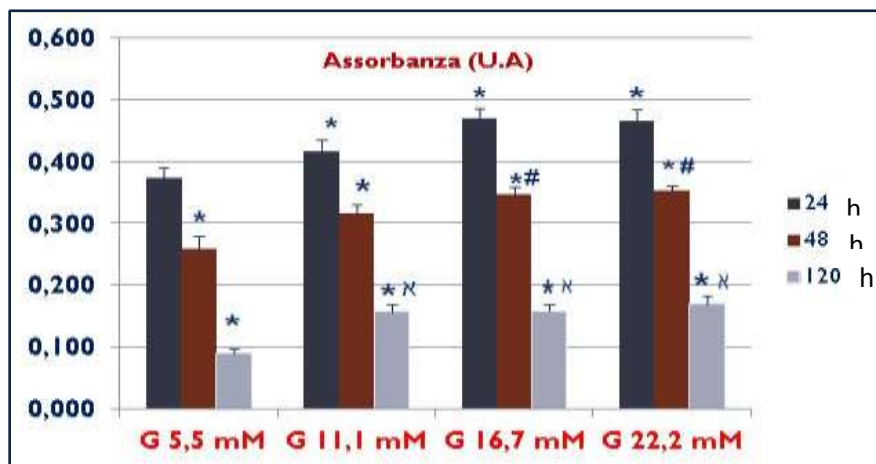


Figura 12. Test di attività metabolica cellulare con MTT su alfa cellule esposte fino a 120 ore a glucosio 5.5, 11.1, 16.7 e 22.2 mmol/l (*= $p < 0.05$ o meno vs glucosio 5.5 mmol/l 24h. Test-t di Student; #= $p < 0.05$ o meno vs glucosio 24h; §= $p < 0.05$ o meno vs glucosio 5.5 mmol/l 120h).

¹⁰⁹ Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electrontransport in MTT reduction. Arch. Biochem. Biophys. 303, 474–482.

Come riportato in **Figura 13**, l'incubazione delle cellule per 24h a glucosio 5.5, 11.1, 16.7 o 22.2 mmol/l non altera la vitalità cellulare. Contrariamente, la vitalità sembra migliorare in relazione al tempo si esposizione delle cellule sia a basso che alto glucosio (**Figura 13**) (*= $p < 0.05$ o meno vs incubazione per 24h. Test-t di Student).

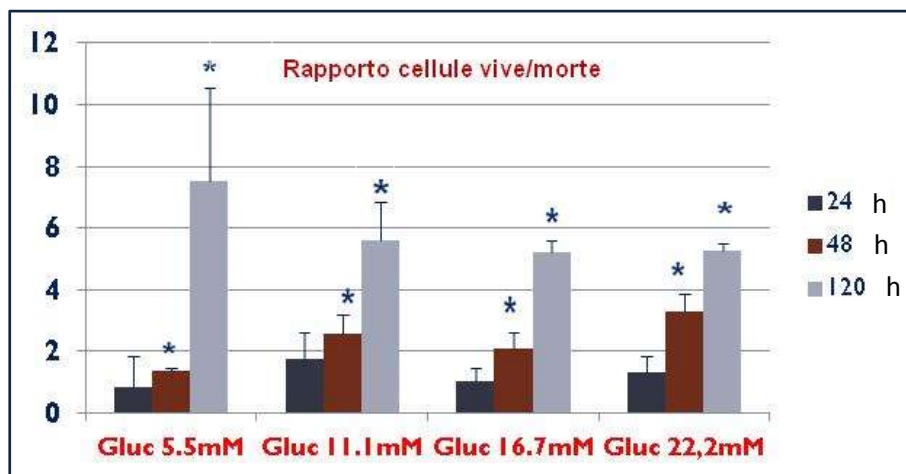


Figura 13. Test di vitalità cellulare con MTT su alfa cellule esposte fino a 120 ore a glucosio 5.5, 11.1, 16.7 E 22.2 mmol/l (*= $p < 0.05$ o meno vs incubazione per 24h. Test-t di Student)

5.3 *Presenza di GLP-1R, PC1/3 e PC2 nelle cellule α -TC1clone 6*

5.3.1 *Studi di immunofluorescenza*

Il primo passo è stato quello di valutare la presenza del recettore del GLP-1 sulle alfa-cellule pancreatiche. Come evidenziato in **Figura 14A**, il recettore è visibilmente espresso sulla superficie cellulare. In **Figura 14B** sono evidenziati i nuclei cellulari attraverso la colorazione in blu con 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI), colorante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T. La fusione delle due immagini, come riportato in **Figura 14C**, indica la presenza del recettore sulle cellule studiate¹¹⁰. (**Figura 14**). (Esempio di studi di immunofluorescenza sulla linea cellulare α -TC1clone 6 esposta a glucosio 16.7 mmol/l. Il pannello A indica la presenza del recettore per GLP-1, il pannello B (DAPI) evidenzia il nucleo cellulare e il pannello C la sovrapposizione delle due sonde.)

¹¹⁰ Zhang LW, McMahon Tobin GA, Rouse RL. Oleic acid and glucose regulate glucagon-like peptide 1 receptor expression in a rat pancreatic ductal cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Oct 15;264(2):274-83

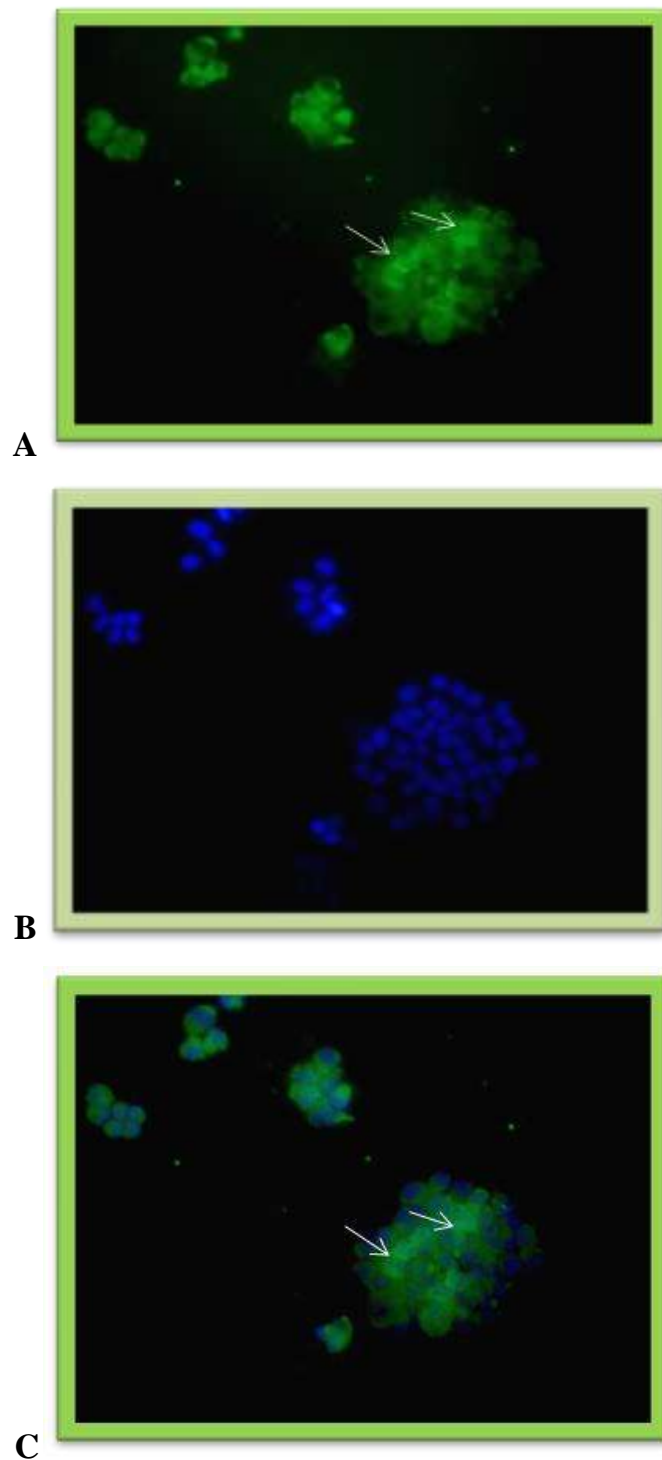


Figura 14A-C. Esempio di studi di immunofluorescenza sulla linea cellulare α -TC1clone 6 esposta a glucosio 16.7 mmol/l. Il pannello A indica la presenza del recettore per GLP-1, il pannello B (DAPI) evidenzia il nucleo cellulare e il pannello C la sovrapposizione delle due sonde.

5.4 Studi di espressione genica

5.4.1 Espressione genica per GLUT-2

Come riportato in **Figura 15**, le alfa cellule pancreatiche murine esprimevano il messaggero per il glucotrasportatore 2. In particolare, l'espressione genica aumentava in modo significativo fino 16h di incubazione delle cellule con glucosio 16.7 mmol/l, rispetto ai nostri controlli esposti a glucosio 5.5 mmol/l. Questo dato ci conferma sia la presenza del recettore sulle alfa cellule, sia che l'azione del glucosio si possa esplicare attraverso il legame con queste proteine di membrana (**Figura 15**) (*= $p < 0.05$ vs 0h. Test di Bonferroni).

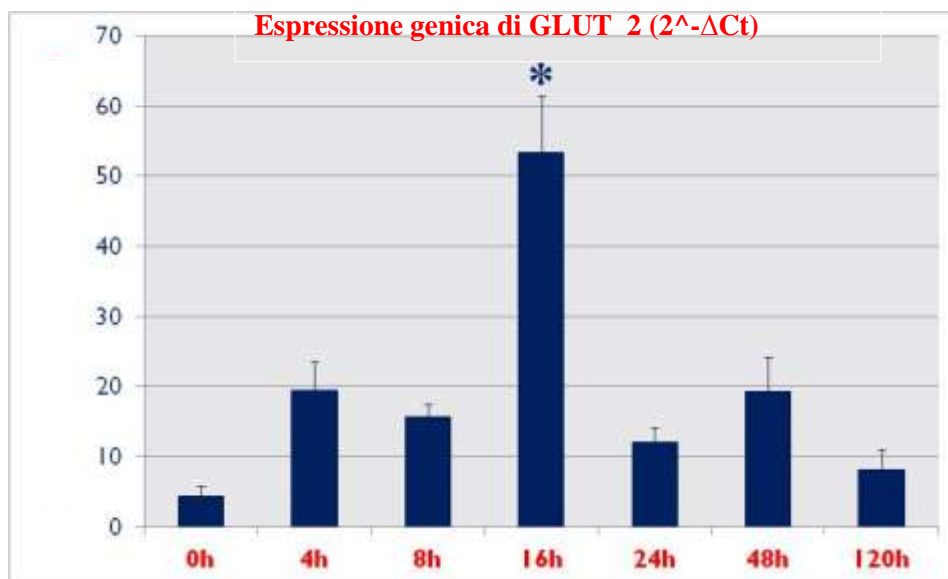


Figura 15. Espressione genica di GLUT-2 su alfa cellule esposte fino a 120h a glucosio 16.7 mmol/l. *= $p < 0.05$ vs 0h. Test di Bonferroni

5.4.2 Espressione genica per GLP-1R

I dati ottenuti con gli studi di immunofluorescenza, sono stati confermati attraverso studi di espressione genica con metodica Real-Time RT-PCR. Nelle cellule esposte a glucosio 5.5 mmol/l, non si sono osservate differenze di espressione genica ai vari tempi di coltura, rispetto al tempo zero (dati non riportati). Tuttavia, quando le alfa-cellule sono state esposte a glucosio 16.7 mmol/l, l'espressione del messaggero per GLP1-R aumentava significativamente, rispetto al tempo zero, nelle cellule tenute in coltura per 8 ore, ritornava a valori simili ai controlli dopo 24 ore (*= $p < 0.05$ vs 0h. Test di Bonferroni) (**Figura 16**).

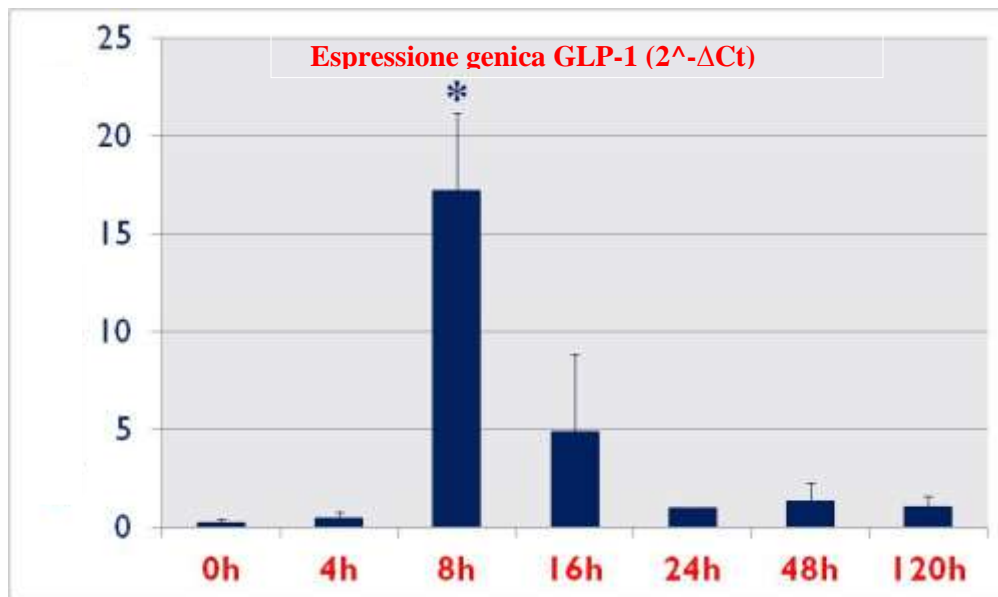


Figura 16. Espressione genica per il recettore per GLP-1 in alfa-cellule esposte fino a 120 ore a glucosio 16.7 mmol/l. L'espressione aumenta significativamente dopo 8 ore rispetto al tempo zero (*= $p < 0.05$ vs 0h. Test di Bonferroni).

5.4.3 Espressione genica per PC1/3 e PC2.

Le alfa-cellule esposte a glucosio 16.7 mmol/l mostravano una differente espressione dell'enzima PC1/3 e PC2 ai vari tempi di incubazione. In particolare, come si può osservare dalla Figura 5A e 5B, sia la pro-ormone convertasi 1/3 che la 2 erano significativamente espresse dopo 8 e 16h di incubazione, rispetto al tempo 0 (*= $p < 0.05$ o meno vs 0h) (**Figura 17A-B**) (*= $p < 0.05$ o meno vs 0h. Test-t di Student).

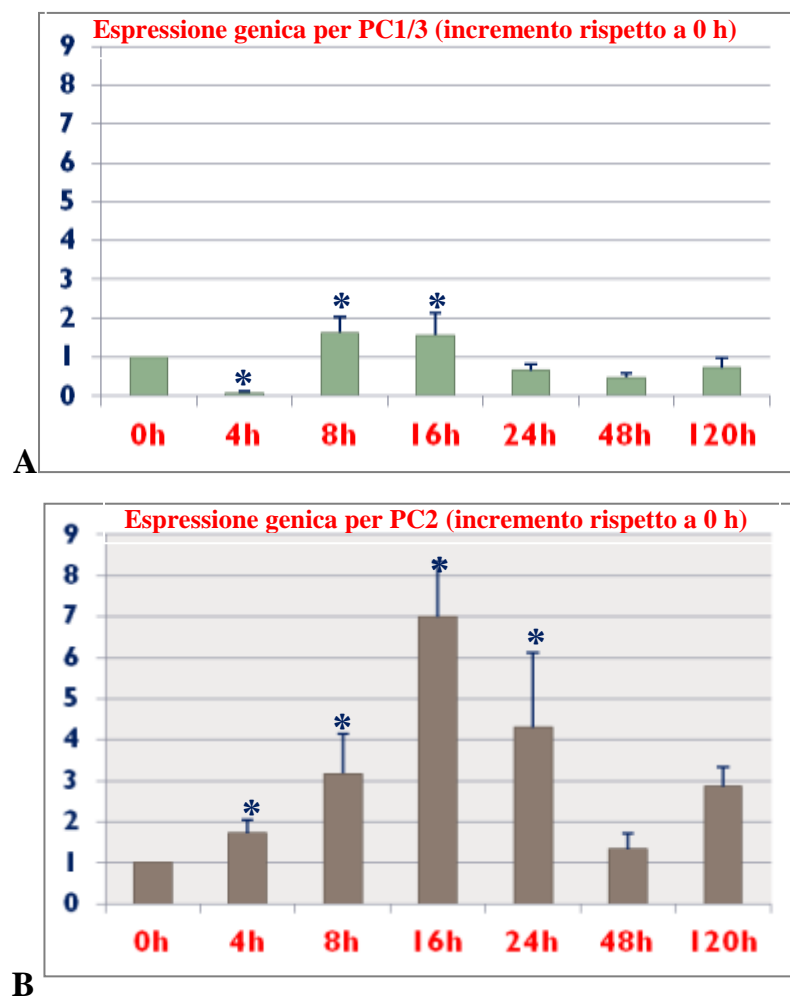


Figura 17. Espressione genica per PC1/3 e PC2. Il pannello **A** indica l'espressione del messaggero per PC1/3 in alfa cellule esposte ad alto glucosio, mentre nel pannello **B** sono riportati i dati di espressione genica per PC2. Per entrambi gli enzimi, dopo 16h di incubazione con glucosio 16.7 mmol/l, l'espressione del messaggero era significativamente maggiore rispetto al tempo 0 (*= $p < 0.05$ o meno vs 0h. Test-t di Student).

5.5 *Risultati studi secrezione GLP-1 Valutazione del GLP-1 totale, attivo e rapporto attivo/totale in cellule α -TC1clone 6 esposte a glucosio 16.7 mmol/l.*

Al termine del periodo di incubazione, nel surnatante delle alfa-cellule esposte sia a glucosio 5.5 (0h) che 16.7 mmol/l (fino a 120h) è stata misurata la secrezione di glucagon-like peptide 1 (GLP-1) totale, attivo e valutato il rapporto della forma attiva su quella totale. Come evidenziato in **Figura 18A**, la concentrazione di GLP-1 totale aumentava significativamente da 4 a 24h di esposizione delle cellule a glucosio 16.7 mmol/l, rispetto al tempo zero in glucosio 5.5 mmol/l (*= $p < 0.05$ vs 0h. Test di Bonferroni) (**Figura 18A**). Parallelamente, anche la forma attiva veniva rilasciata nel mezzo in quantità significativamente aumentate fino alle 24h di incubazione delle alfa-cellule in glucosio 16.7 mmol/l, rispetto al controllo (*= $p < 0.05$ vs 0h. Test di Bonferroni) (**Figura 18B**). Il rapporto fra le due forme di GLP-1 indicava che, durante tutto il periodo d'incubazione, la quantità di forma attiva veniva rilasciata in maniera proporzionale a quella totale, in una percentuale di circa il 60% (**Figura 18C**).

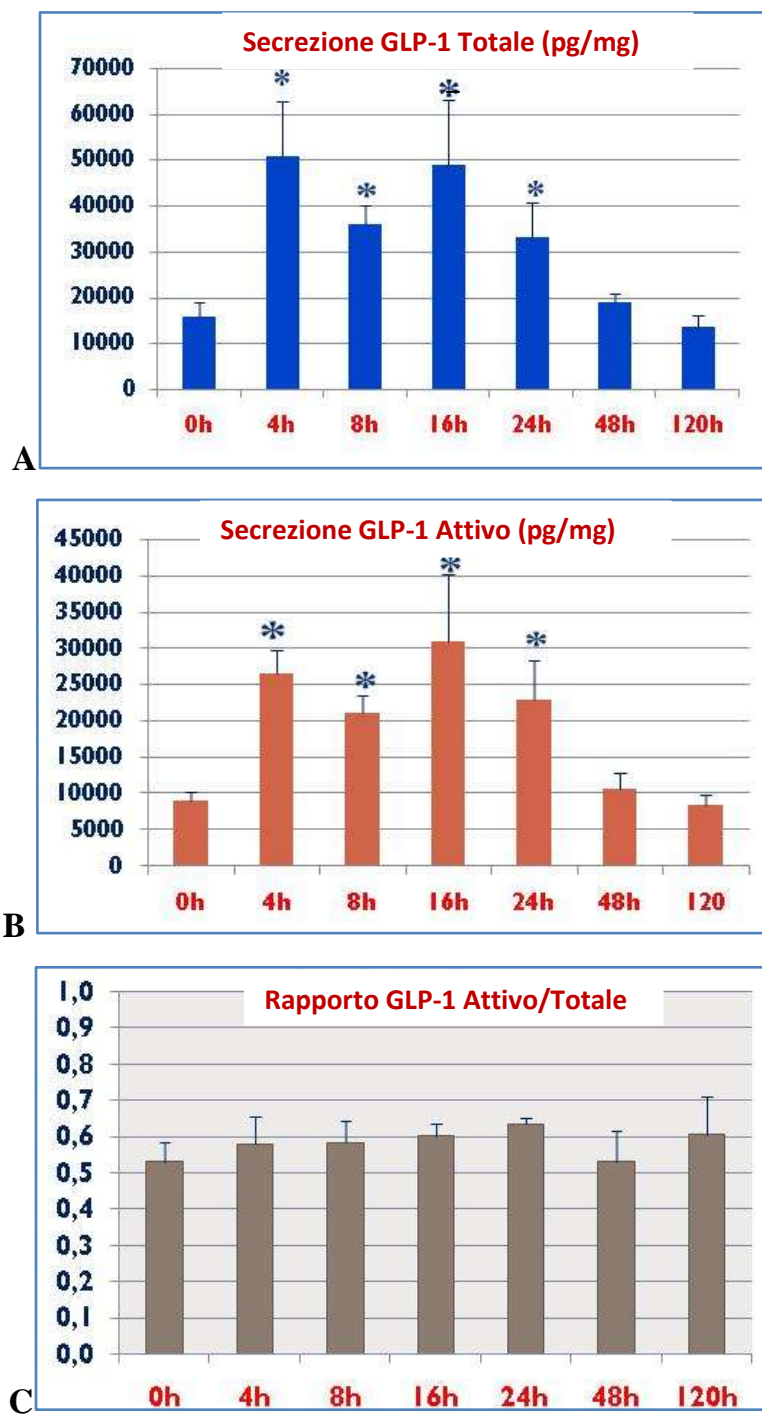


Figura 18. Secrezione di GLP-1 totale (A), attivo (B) e rapporto fra le due forme (C). Rispetto al tempo 0, la secrezione sia della totale che dell'attiva aumentavano significativamente fino a 24h (*= $p < 0.05$ vs 0h. Test di Bonferroni). Il rapporto fra le due forme indicava un rilascio proporzionale durante tutto il periodo d'incubazione a glucosio 16.7 mmol/l.

5.6 Risultati degli studi di secrezione del glucagone

La misurazione della secrezione di rilascio di glucagone¹¹¹ da parte delle alfa-cellule pancreatiche è stata valutata tramite saggio ELISA. Come riportato in **Figura 19**, sembra che l'alto glucosio determini una riduzione significativa del rilascio dell'ormone solo dopo 8h di esposizione a glucosio 16.7 mmol/l, rispetto al tempo 0 in glucosio 5.5 mmol/l (*= $p < 0.05$ vs 0h) (Test di Bonferroni).

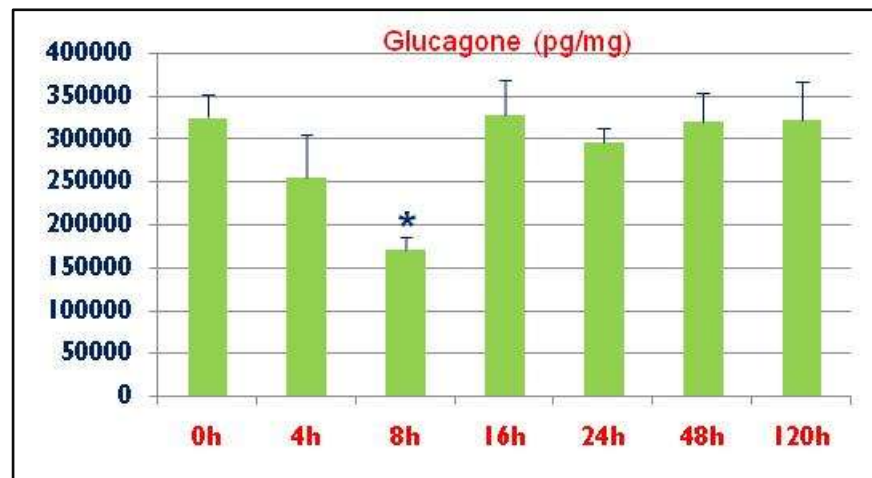


Figura 19. Secrezione di glucagone nel terreno di coltura di alfa-cellule esposte a glucosio 16.7 mmol/l. Dopo 8h si osserva una significativa riduzione della concentrazione dell'ormone rispetto al controllo (*= $p < 0.05$ vs 0h. Test di Bonferroni).

¹¹¹ Heller RS, Aponte GW: Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1 (7-36)amide. Am J Physiol 269:G853–G860, 1995

Dato interessante, dal rapporto fra il GLP-1 totale, il GLP-1 attivo e il glucagone è emerso che il glucosio induce, fino a 24h, una secrezione dell'incertina significativamente maggiore rispetto all'ormone, rispetto al tempo 0 delle cellule incubate con glucosio 5.5 mmol/l. Questo dato sembra indicare che le alfa-cellule pancreatiche producono GLP-1 anche in forma attiva e che questo, molto probabilmente, potrebbe svolgere un ruolo a livello della cellula stessa (**Figura 20A-B**) (*= $p < 0.05$. Test di Bonferroni).

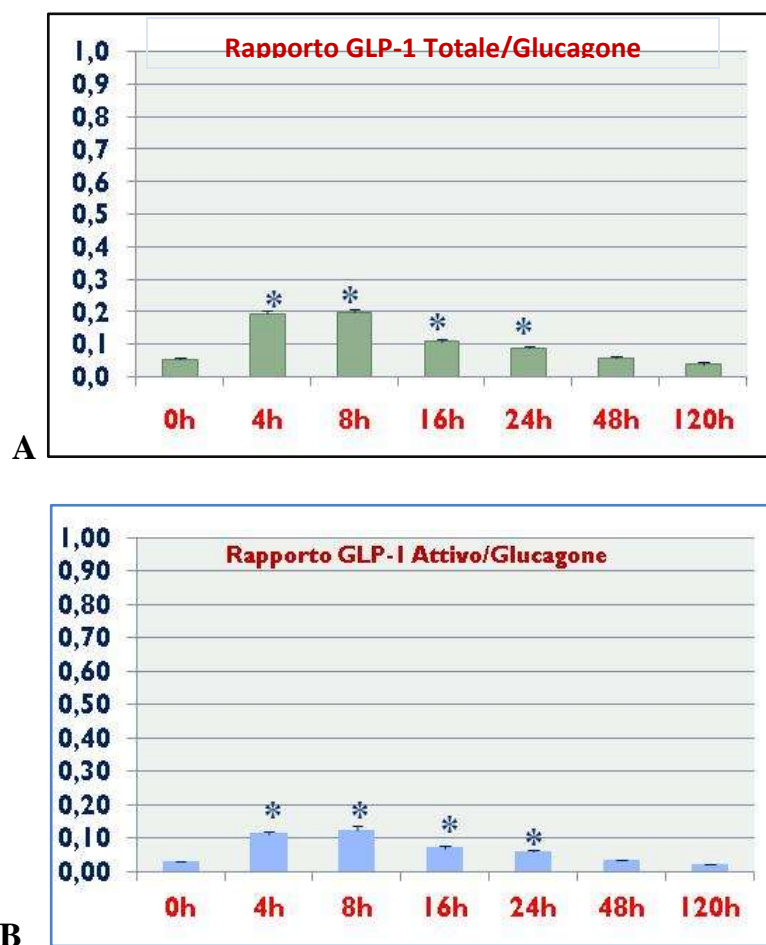


Figura 20. Rapporto fra la secrezione di GLP-1 totale, attivo e il glucagone. I nostri risultati indicano una secrezione dell'incertina significativamente maggiore rispetto al glucagone, in alfa-cellule incubate fino a 24 h con glucosio 16.7 mmol/l (*= $p < 0.05$. Test di Bonferroni)

5.7 Studio del GLP-1 in alfa-cellule pancreatiche murine (α -TC1clone 6) esposte ad elevata concentrazione di acidi grassi liberi (FFA)

5.7.1 Attività metabolica

Come riportato in **Figura 21**, la presenza di una miscela di acidi grassi a catena lunga 0.5 mmol/l nel terreno di coltura di alfa-cellule murine coltivate in presenza di glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, ha determinato variazioni significative della vitalità cellulare, valutata con MTT, rispetto al dato con glucosio da solo. In particolare, la vitalità delle cellule era significativamente ridotta già dalle 6 h di incubazione, rispetto al controllo a 0h (**Figura 21**) (*= $p < 0.05$ vs Glucosio 5.5 mmol/l 0h. Test di Bonferroni).

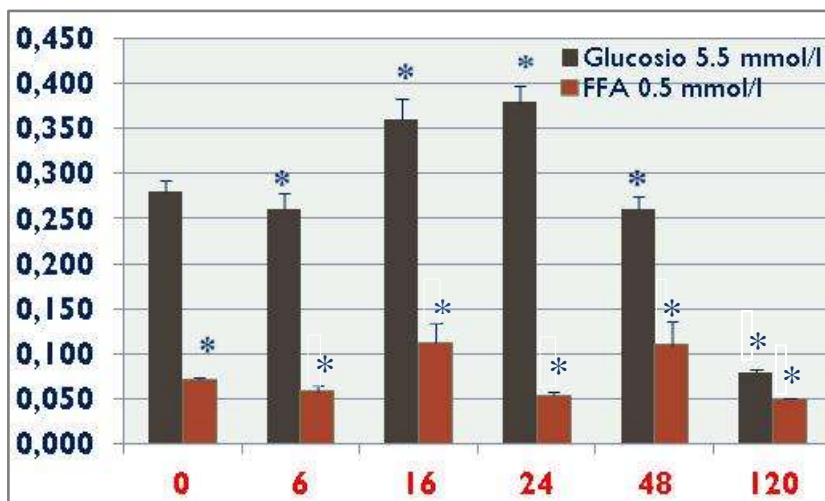


Figura 21. Test di attività metabolica cellulare con MTT su alfa cellule esposte fino a 120 ore a glucosio 5.5 mM con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l. La vitalità, in presenza di FFA è significativamente ridotta rispetto ai controlli (*= $p < 0.05$ o meno vs glucosio 5.5 mmol/l. Test-t di Student).

5.7.2 Valutazione del tasso di apoptosi cellulare

Come riportato in **Figura 22**, 16 ore di coltura delle alfa cellule in presenza di un'elevata concentrazione di glucosio e acidi grassi sembra modulare sia il processo di apoptosi che quello di necrosi. In particolare, la presenza dei FFA induce un aumento significativo del tasso di apoptosi, rispetto alle nostre cellule di controllo incubate con glucosio 5.5 mmol/l (*= $p<0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferoni). Alle nostre condizioni sperimentali, l'alto glucosio non sembra attivare l'apoptosi. Per quanto riguarda la necrosi, in condizioni di iperglicemia sembra ridursi in modo significativo rispetto ai controlli (*= $p<0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferoni). In questo caso, non sembra che i FFA alterino il processo di necrosi cellulare (**Figura 22**).

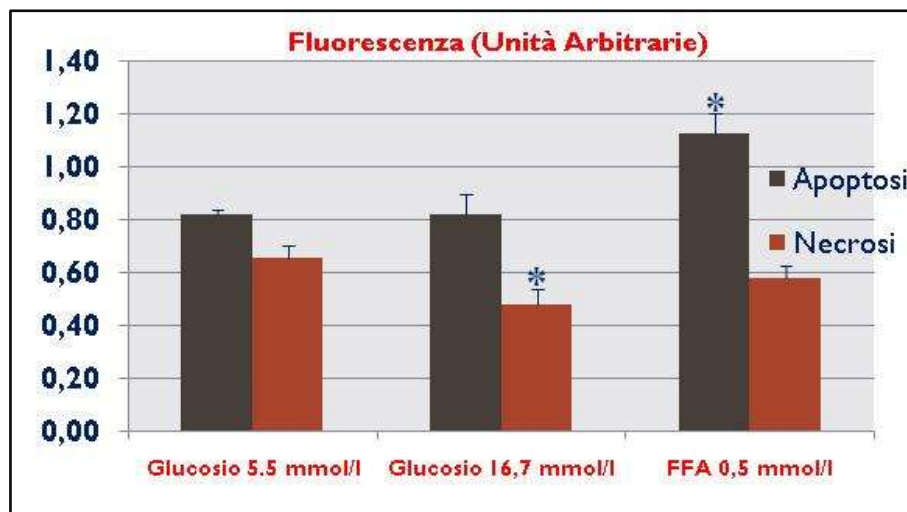


Figura 22. Valutazione del tasso di apoptosi (verde) e di necrosi (rosso) in alfa cellule esposte per 16h a glucosio 16.7 mmol/l e FFA 0.5 mmol/l. Il tasso di apoptosi aumenta in presenza di FFA, mentre la necrosi si riduce in presenza di alto glucosio (*= $p<0.05$ vs rispettivo glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni)

5.7.3 Studi di espressione genica

5.7.3.1 Espressione genica per GLP-1R

Le alfa-cellule incubate per 16 h in presenza di FFA alla concentrazione 0.5 mmol/l hanno evidenziato un'alterazione nell'espressione del recettore¹¹² per il GLP-1. Come riportato in **Figura 23**, la presenza degli acidi grassi riduce significativamente l'espressione del GLP-1R dopo stimolo con glucosio 16.7 mmol/l, rispetto ai controlli. La presenza nel terreno di coltura dei FFA non riduce del tutto la sensibilità al glucosio, mantenendo una differenza significativa nell'induzione dell'espressione del recettore dopo stimolo con basso ed alto glucosio. Tuttavia, rispetto ai controlli, questa differenza si riduce marcatamente (*= $p<0.01$ vs Glucosio 5.5 mmol/l; #= $p<0.01$ vs Glucosio 16.7 mmol/l controlli. Test-t di Student) (**Figura 23**)

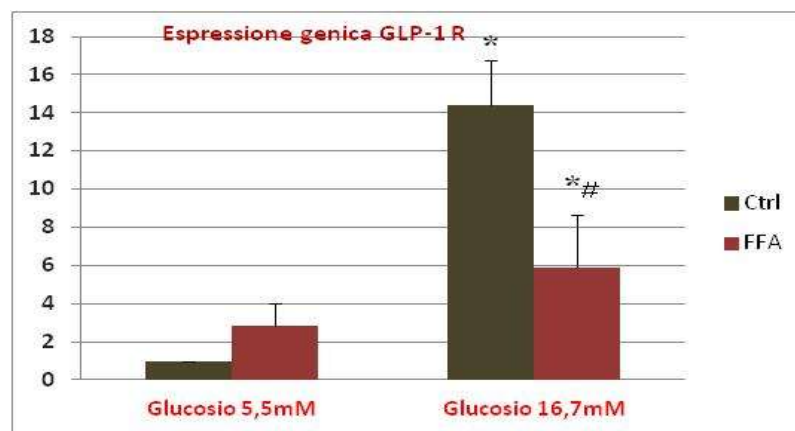


Figura 23. Espressione genica per il recettore per GLP-1 in alfa-cellule esposte fino a 16 ore a FFA 0.5 mmol/l. Al termine del periodo d'incubazione, l'espressione del messaggero era marcatamente ridotta dopo stimolo con basso ed alto glucosio, rispetto ai controlli (*= $p<0.01$ o meno vs Glucosio 5.5 mmol/l; #= $p<0.01$ vs Glucosio 16.7 mmol/l. Test-t di Student).

¹¹² Patzelt C, Schiltz E. Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Aug;81(16):5007–5011.

5.7.3.2 Espressione genica per PC1/3 e PC2.

Come riportato in **Figura 24A-B**, l'incubazione delle alfa cellule per 16h in presenza di una miscela di acidi grassi a catena lunga ha determinato un'alterazione dell'espressione¹¹³ sia di PC1/3 (**A**) che di PC2 (**B**). In particolare, la presenza di acidi grassi nel terreno di coltura induce un significativo aumento dell'espressione di PC1/3 dopo stimolo con glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, rispetto al controllo (*= $p < 0.05$ o meno. Test-t di Student). Per quanto riguarda l'espressione di PC2, dopo esposizione a FFA si riduce significativamente quando le cellule vengono stimulate con glucosio 5.5 mmol/l, mentre lo stimolo con alto glucosio tende a riportare l'espressione simile ai controlli (**Figura 24A-B**) (*= $p < 0.05$ o meno. Test-t di student).

¹¹³ Smeekens SP, Avruch AS, LaMendola J, Chan SJ, Steiner DF. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 15;88(2):340–344. [

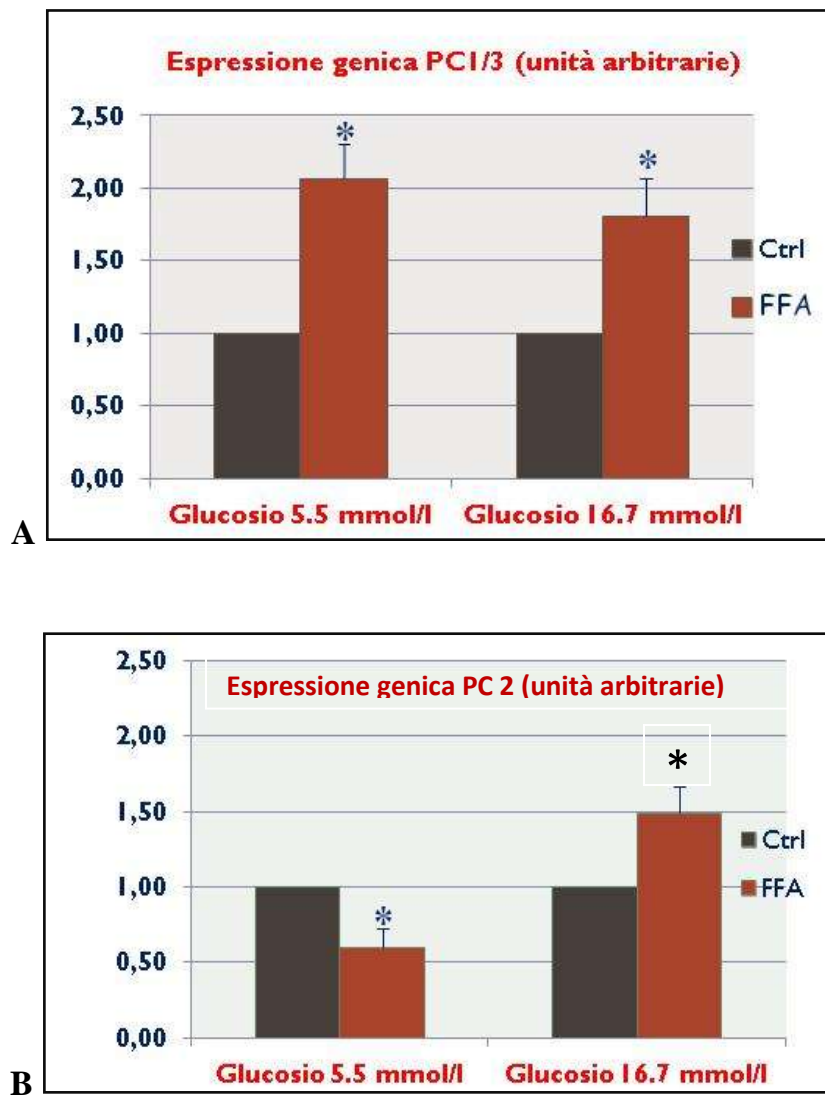


Figura 24. Espressione genica per PC1/3 (panello **A**) e PC2 (pannello **B**) in alfa cellule esposte per 16h a FFA 0.5 mmol/l. Gli acidi grassi sono in grado di modulare l'espressione nelle alfa cellule di entrambi gli enzimi (*= $p < 0.05$ o meno. Test-t di student).

5.7.4 Risultati degli studi di secrezione del GLP-1. Valutazione del GLP-1 totale, attivo e rapporto attivo/totale in cellule α -TC1clone 6 esposte a FFA 0.5 mmol/l.

L'esposizione per 16 h delle alfa cellule ad un'elevata concentrazione di acidi grassi liberi non ha indotto una significativa riduzione, rispetto ai controlli, della secrezione di GLP-1 nella forma totale quando le cellule, al termine del periodo di incubazione, sono state stimulate con glucosio 5.5 mmol/l (**Figura 25A**. $*=p<0.001$. test-t di Student). Al contrario, è stata osservata dopo stimolo con glucosio 16.7 mmol/l un aumento della forma totale. I nostri dati sperimentali non hanno evidenziato differenze significative nella secrezione della forma attiva del GLP-1 dopo esposizione delle alfa cellule ad FFA e stimolo con alto e basso glucosio (**Figura 25B**). Tuttavia, dal rapporto fra le due forme del GLP-1 si evince che, nelle cellule esposte a FFA 0.5 mmol/l e glucosio 16.7 mmol/l, il GLP-1 totale viene prodotto, in proporzione, significativamente di più rispetto alle cellule non trattate con acidi grassi (**Figura 25C**). ($*=p<0.01$ vs Ctrl. Test-t di Student). Il rapporto indicava un rilascio maggiore della forma attiva nelle cellule esposte a FFA e stimulate con glucosio 5.5 mmol/l ($*=p<0.05$ vs Ctrl. Test-t di Student) e un aumento della forma totale durante tutto il periodo di incubazione a glucosio 16.7 mmol/l. (**Figura 25**).

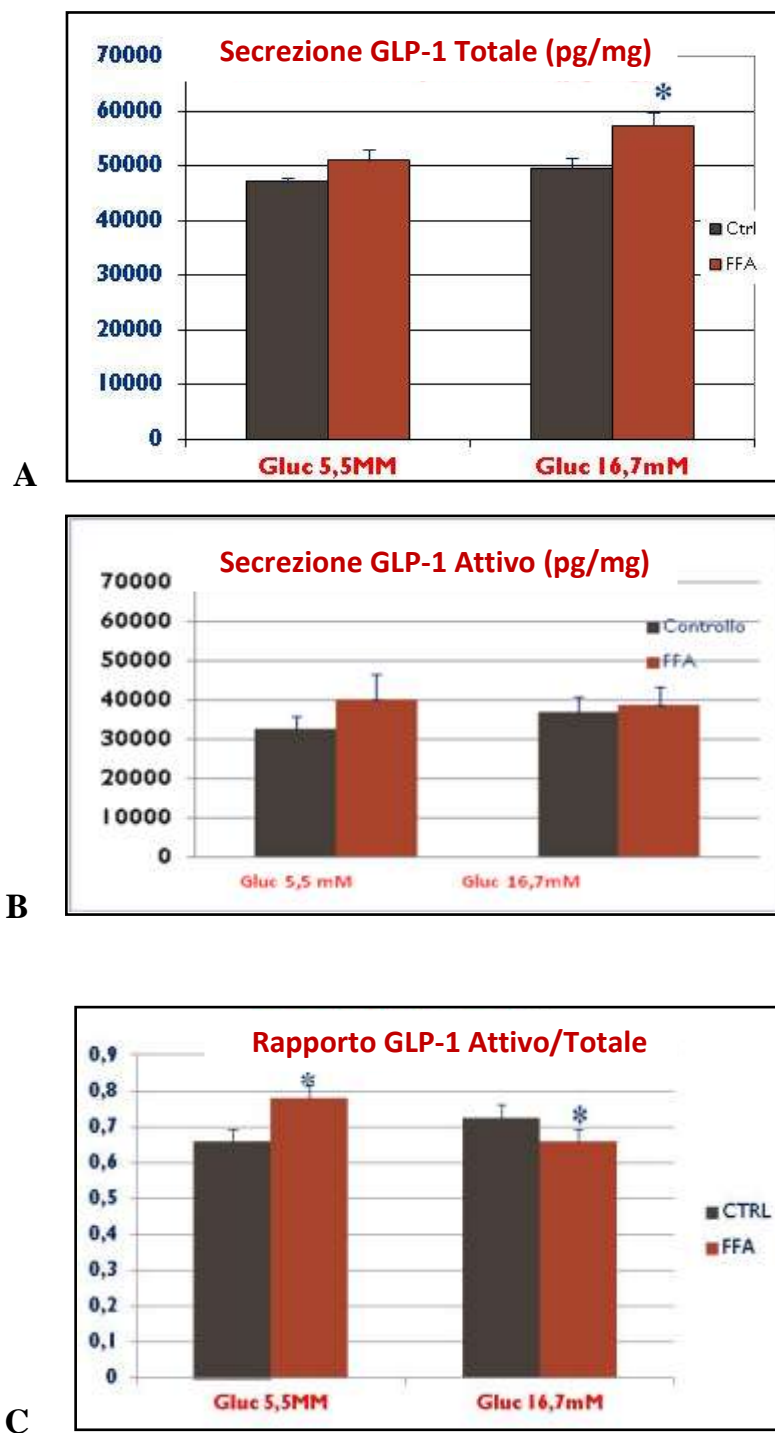


Figura 25. Secrezione di GLP-1 totale (A), attivo (B) e rapporto fra le due forme (C). Rispetto ai controlli, la secrezione della forma totale aumenta significativamente in cellule trattate con FFA e stimulate con glucosio 16.7 mmol/l. (*= $p < 0.01$ vs Ctrl. Test-t di Student). Il rapporto indicava un rilascio maggiore della forma attiva nelle cellule esposte a FFA e stimulate con glucosio 5.5 mmol/l (*= $p < 0.05$ vs Ctrl. Test-t di Student) e un aumento della forma totale durante tutto il periodo di incubazione a glucosio 16.7 mmol/l.

5.7.5 Risultati degli studi di secrezione del glucagone

Un risultato interessante è rappresentato da una significativa riduzione della secrezione di glucagone in alfa cellule esposte per 16h a FFA 0.5 mmol/l. Come riportato in **Figura 26**, c'è una ridotta secrezione del glucagone sia dopo stimolo con glucosio 5.5 che 16.7 mmol/l, rispetto ai controlli ($=p<0.05$ vs 5.5 MM. Test-t di Student) (**Figura 26**)

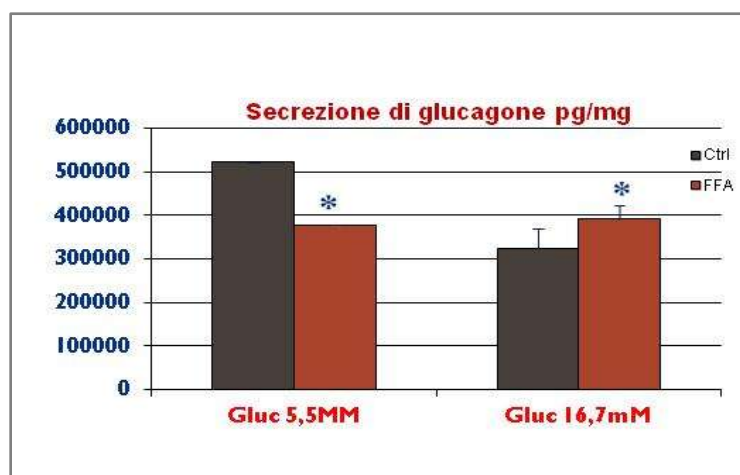


Figura 26. Secrezione di glucagone nel terreno di coltura di alfa-cellule esposte a FFA 0.5 mmol/l. Dopo 16h si osserva una significativa riduzione della concentrazione dell'ormone rispetto al controllo, sia dopo stimolo con glucosio 5.5 che 16.7 mmol/l ($=p<0.05$ vs 5.5 MM Test-t di Student).

Quando la secrezione del GLP-1 in forma totale che attiva è stata rapportata a quella del glucagone è emerso che, nelle alfa cellule esposte per un lungo periodo a un'elevata concentrazione di acidi grassi a catena lunga, la quantità di GLP-1 totale e attivo che è prodotta aumenta rispetto alla concentrazione di glucagone secreta (**Figura 27A-B**).

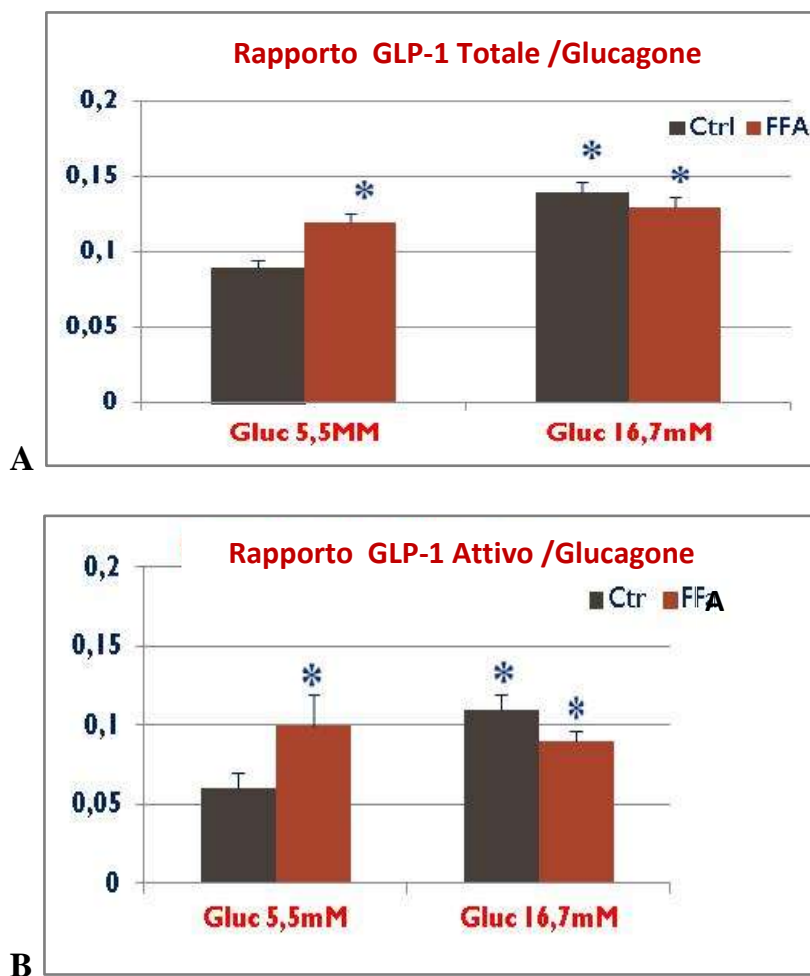


Figura 27. Rapporto fra la secrezione di GLP-1 totale (A), attivo (B) ed il glucagone. I nostri risultati indicano differenze significative fra controlli e cellule incubate con FFA.

Capitolo 6. *Discussione dei risultati*

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare la sintesi e la secrezione di Glucagon-Like peptide 1 (GLP-1) da parte delle alfa cellule pancreatiche murine e capire se l'incertina prodotta potesse modulare o no la vitalità e la funzionalità delle stesse cellule.

Com'è noto, il diabete mellito è una sindrome eterogenea, comprendente varie forme cliniche, di cui le più frequenti sono il diabete tipo 1, caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina, dovuto alla distruzione autoimmune delle cellule beta delle isole di Langerhans, e, soprattutto, il diabete tipo 2, in cui sono presenti, oltre alla carenza di insulina, fenomeni di resistenza all'azione dell'ormone^{114,115,116}. Sono stati fatti notevoli progressi nello studio e nella valutazione funzionale delle isole pancreatiche, che costituiscono non più dell'1-2% della massa pancreatica complessiva^{117,118,119}. Sono strutture che contengono vari tipi di cellule endocrine, di cui le più rappresentate sono le cellule beta produttrici insulina (60-80%) e le cellule alfa produttrici glucagone (20-30%). In questi ultimi anni i ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione principalmente sullo studio delle beta-cellule pancreatiche, andando a studiarne i meccanismi che regolano la sintesi ed il

¹¹⁴ Ginter E, Simko V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:42-50. Review.

¹¹⁵ Song SH. Emerging type 2 diabetes in young adults. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:51-61. Review.

¹¹⁶ Johnson EL. Glycemic variability in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress and macrovascular complications. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:139-54. Review.

¹¹⁷ Weir GC, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Apr;1281:92-105.

¹¹⁸ Portha B, Giroix MH, Turrel-Cuzin C, Le-Stunff H, Movassat J. The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. *Methods Mol Biol.* 2012;933:125-59.

¹¹⁹ Nyalakonda K, Sharma T, Ismail-Beigi F. Preservation of beta-cell function in type 2 diabetes. *Endocr Pract.* 2010 Nov-Dec;16(6):1038-55.

rilascio dell'insulina, nonché dalla massa complessiva delle cellule stesse. Tuttavia, in letteratura sono presenti pochi studi riguardo al ruolo delle cellule alfa nella funzionalità insulare^{120,121,122,123}. Le cellule alfa sintetizzano e rilasciano il glucagone. Tale ormone è il risultato finale di una serie di modifiche a carico del proglucagone, che rappresenta il reale polipeptide derivante dalla trascrizione del gene corrispondente. L'azione di enzimi proteolitici con specificità tissutale porta, infatti, attraverso clivaggi successivi, dal proglucagone al glucagone attraverso la PC2 (pro-hormon convertase 2) e al GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) e GLP-2 (Glucagon-like peptide 2) attraverso la PC1/3. Fino a pochi anni fa si riteneva che nelle cellule intestinali ci fosse la presenza solo della PC1/3 e che questo determinasse la produzione e la secrezione delle due incretine, senza possibilità di secrezione di glucagone. Al contrario, era ritenuto che le alfa cellule pancreatiche fossero in grado solo di secernere glucagone, poiché completamente assente la PC1/3 e con sintesi solo della PC2.^{124,125} Recentemente, è stato pubblicato uno studio portato avanti nel nostro laboratorio in cui abbiamo dimostrato la presenza di un sistema di produzione del GLP-1 nelle isole pancreatiche umane, che risiede nelle cellule alfa e potrebbe essere alterato nei pazienti con diabete mellito tipo 2¹²⁶. In vivo, il GLP-1 stimola la secrezione insulinica,

¹²⁰ Habener JF, Stanojevic V. α -cell role in β -cell generation and regeneration. *Islets*. 2012 May-Jun;4(3):188-98.

¹²¹ Christensen M, Bagger JJ, Vilsbøll T, Knop FK. The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy. *Rev Diabet Stud*. 2011 Fall;8(3):369-81.

¹²² Rorsman P, Braun M, Zhang Q. Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. *Cell Calcium*. 2012 Mar-Apr;51(3-4):300-8.

¹²⁴ le Roux CW, Borg C, Wallis K, Vincent RP, Bueter M, Goodlad R, Ghatei MA, Patel A, Bloom SR, Aylwin SJ. Gut hypertrophy after gastric bypass is associated with increased glucagon-like peptide 2 and intestinal crypt cell proliferation. *Ann Surg*. 2010 Jul;252(1):50-6.

¹²⁵ Dong CX, Brubaker PL. Ghrelin, the proglucagon-derived peptides and peptide YY in nutrient homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Dec;9(12):705-15.

¹²⁶ Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, Del Guerra S, D'Aleo V, Piro S, Marselli L, Boggi U, Filipponi F, Tinti L, Salvini L, Wollheim CB,

riduce o sopprime il rilascio di glucagone (che risulta inappropriatamente elevato nei pazienti diabetici di tipo 2) e incrementa la massa di cellule beta stimolando la rigenerazione delle cellule pancreatiche^{127,128,129}.

I risultati preliminari ottenuti in questa tesi sembrano indicare che l'iperglicemia, uno dei fattori acquisiti presenti nel diabete mellito tipo 2, possa indurre nelle alfa cellule pancreatiche un incremento dell'espressione dell'enzima PC1/3 con aumento della secrezione di GLP-1 nella sua forma totale ed, in particolare, in quella attiva. Questo potrebbe avere un effetto protettivo sulle alfa cellule stesse, mediato da un aumento della concentrazione di GLP-1 attivo nel terreno di coltura in cellule esposte ad elevato glucosio, associato ad una riduzione della necrosi, un aumento della vitalità ed un aumento della funzionalità cellulare. Infatti, com'è noto da numerosi studi presenti in letteratura, l'apoptosi svolge un ruolo importante nella patogenesi del diabete mellito tipo 2 ed il GLP-1, fra le altre caratteristiche, è stato visto avere proprietà antiapoptotiche^{130,131,132}.

Nel nostro studio, l'esposizione delle alfa cellule a una perturbazione metabolica tipica del diabete mellito tipo 2, quale l'ipernefemia, causa un aumento della secrezione dell'incetina nel terreno di coltura, una ridotta espressione del recettore per GLP-1, un'evidente alterazione della vitalità e del

Purrello F, Dotta F. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2012 Dec;55(12):3262-72.

¹²⁷ Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2013 Jan 1;9(1):25-53.

¹²⁸ Jun HS. In vivo regeneration of insulin-producing beta-cells. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:627-40. doi: 10.1007/978-90-481-3271-3_27. Review.

¹²⁹ Bouwens L, Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev*. 2005 Oct;85(4):1255-70. Review.

¹³⁰ van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:792393.

¹³¹ Perfetti R, Hui H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. *Horm Metab Res*. 2004 Nov-Dec;36(11-12):804-10. Review.

¹³² Perfetti R, Hui H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. *Horm Metab Res*. 2004 Nov-Dec;36(11-12):804-10. Review.

tasso di apoptosi, associato ad una ridotta funzionalità cellulare. Alla luce di quanto osservato in questa tesi, si potrebbe dedurre che l'effetto protettivo sulle alfa cellule dovuto a un aumento di secrezione del GLP-1 a seguito di un'esposizione cellulare ad elevata concentrazione di glucosio, potrebbe essere annullato dall'esposizione delle cellule stesse ad acidi grassi saturi liberi (lipotossicità), condizione tipica del diabete mellito di tipo 2, che causa una riduzione del recettore per l'incertina associata ad una minore vitalità e funzionalità alfa cellulare. D'altro canto, poiché il diabete di tipo 2 nell'uomo è spesso associato con l'obesità e con iperlipidemia e iperglicemia, molti studi sono stati effettuati in questi ultimi anni sul ruolo negativo che alti livelli di acidi grassi liberi o altri lipidi potrebbero avere nella vitalità e nella funzionalità delle isole pancreatiche. Infatti, vi è ampia evidenza che gli acidi grassi, che in circostanze normali sono i carburanti fisiologici per la beta cellula, diventano tossici se presenti in concentrazioni elevate per lunghi periodi di tempo¹³³. Effetti negativi dell'esposizione cronica della beta cellula a elevate concentrazioni di acidi grassi sono la ridotta secrezione dell'insulina indotta dal glucosio^{134,135,136-137}, l'alterata espressione genica dell'insulina^{138,139,140}

¹³³ McGarry JD, Dobbins RL: Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42:128–138,1999

¹³⁴ Sako Y, Grill VE: A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* 127 :1580 –1589,1990;Elks ML

¹³⁵ Zhou YP, Grill VE: Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93 :870 –876,1994

¹³⁶ Zhou YP, Grill V: Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 80 :1584 –1590,1995

¹³⁷ Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, D'Onofrio F: Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 38 :1295 –1299,1995

¹³⁸ Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B: Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* 272 :30261 –30269,1997

e l'aumento della morte cellulare^{141,142,143}. Alcuni studi hanno dimostrato che il GLP-1 prodotto dalle cellule L intestinali sembra essere in grado di ridurre gli effetti tossici, nella beta cellula, della lipotossicità indotta dalla presenza di elevate concentrazioni di acidi grassi liberi. Tuttavia, i meccanismi alla base di questo fenomeno non sono del tutto noti^{144,145}. Come dimostrato da HAN YB et al¹⁴⁶, l'effetto protettivo del GLP-1 contro l'apoptosi indotta da palmitato in cellule INS-1 sembra essere mediato dalla presenza del microRNA miR-34a, fornendo una possibile spiegazione di come il GLP-1 possa diminuire l'apoptosi nelle linee cellulari beta pancreatiche.

In questo contesto, gli studi preliminari presentati in questa tesi hanno evidenziato la presenza di un sistema di produzione delle incretine nelle alfa cellule pancreatiche e potrebbero suggerire che la lipotossicità, tipica del diabete mellito tipo 2, sia in grado di ridurre la funzionalità, la vitalità e la massa beta cellulare alterando la secrezione di GLP-1 nelle alfa-cellule.

¹³⁹ Ritz-Laser B, Meda P, Constant I, Klages N, Charollais A, Morales A, Magnan C, Ktorza A, Philippe J: Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate. *Endocrinology*140 :4005 –4014,1999

¹⁴⁰ Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V: Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic β -cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism*49 :532 –536,2000

¹⁴¹ Milburn JL Jr, Hirose H, Lee YH, Nagasawa Y, Ogawa A, Ohneda M, BeltrandelRio H, Newgard CB, Johnson JH, Unger RH: Pancreatic β -cells in obesity: evidence for induction of functional, morphologic, and metabolic abnormalities by increased long chain fatty acids. *J Biol Chem*270 :1295 –1299,1995

¹⁴² Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH: Fatty acid-induced β -cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*95 :2498 –2502,199

¹⁴³ Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY: Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes*50 :69 – 76,2001

¹⁴⁴ Asmar M. New physiological effects of the incretin hormones GLP-1 and GIP. *Dan Med Bull.* 2011 Feb;58(2):B4248. Review.

¹⁴⁵ Tremblay AJ, Lamarche B, Deacon CF, Weisnagel SJ, Couture P. Effect of sitagliptin therapy on postprandial lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2011 Apr;13(4):366-73.

¹⁴⁶ Han YB, Wang MN, Li Q, Guo L, Yang YM, Li PJ, Wang W, Zhang JC. MicroRNA-34a contributes to the protective effects of glucagon-like peptide-1 against lipotoxicity in INS-1 cells. *Chin Med J (Engl).* 2012 Dec;125(23):4202-8

Inoltre, i nostri dati rafforzano l'ipotesi di una proprietà anti-apoptotica del GLP-1. Proteggere sia la cellula beta sia quella alfa contro l'apoptosi può portare ad approcci terapeutici innovativi che sono destinati a potenziare la secrezione di GLP-1 nel pancreas stesso con conseguente miglioramento della massa delle isole, protezione e potenziamento della funzionalità beta cellulare soprattutto in presenza di elevate concentrazioni di acidi grassi liberi, rallentando così la comparsa del diabete mellito tipo 2.

Capitolo 7. Bibliografia

AM, Purrello F, Marchetti P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2005 Feb;48(2):282-9.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29 (suppl 1):S43:8.;

Aminian M, Nabatchian F, Vaisi-Raygani A, Torabi M. *Anal Biochem*. 2013 Mar 15;434(2):287-91. doi: 10.1016/j.ab.2012.11.014. Epub 2012 Dec 3. PMID: 23219565

Andovici I, Hammerle CM, Ozanne SE, Constância M. Developmental and environmental epigenetic programming of the endocrine pancreas: consequences for type 2 diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2013 May;70(9):1575-95.

Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo

Asmar M. New physiological effects of the incretin hormones GLP-1 and GIP. *Dan*

Augeri DJ, Robl JA, Betebenner DA, Magnin DR, Khanna A, Robertson JG, Wang A, Simpkins LM, et al. *J Med Chem* 48, 5025-5037, 2005

Bakshi D, Singhal P, Mahajan SK, Subramaniam P, Tuteja U, Batra HV. Development of a real-time PCR assay for the diagnosis of scrub typhus cases in India and evidence of the prevalence of new genotype of *O. tsutsugamushi*. *Acta Trop*. 2007 Oct;104(1):63-71.

Baldwin AC, Green CD, Olson LK, Moxley MA, Corbett JA. A role for aberrant protein palmitoylation in FFA-induced ER stress and β -cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jun 1;302(11):E1390-8.

Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes* 1987;36:274-83

Baruah MP, Chaudhury T, Sethi BK, Dharmalingam M. Liraglutide in type 2 diabetes mellitus. *J Indian Med Assoc*. 2012 May;110(5):335-8. Review.

Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Nov 25;364(1-2):1-27

Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet*. 2013 Apr;132(4):359-83.

Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-Biol. 2012;771:240-51. Review.

Bode BW. Deining the importance of daily glycemic control and implications for type 2 diabetes management. *Postgrad Med.*, 121(5):82-93, 2009.

Borg J, Klint C, Wierup N, Strom K, Larsson S, Sundler F, Lupi R, Marchetti P, Xu G, Kimmel A, Londos C, Holm C. Perilipin is present in islets of Langerhans and protects against lipotoxicity when overexpressed in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology*. 2009 Jul;150(7):3049-57.

Boslem E, Meikle PJ, Biden TJ. Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic β -cell function and dysfunction. *Islets*. 2012 May-Jun;4(3):177-87.

Bouwens L, Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev*. 2005 Oct;85(4):1255-70. Review.

Brown DX, Choudhury M, Evans M. Linagliptin as add-on therapy for type 2 diabetes - an overview. *Drugs Today (Barc)*. 2012 Oct;48(10):645-54.

Brunton S. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. *Postgrad Med.*, 121(5):68-81, 2009.

Brunton SA. Integrating incretin-based therapy into type 2 diabetes management. *J Fam Pract*. 2013 Jun;62(6 Suppl CME):S1-8.

Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009 Feb;37(3):e21

Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 15;30(10):e47

Chai Z, Ma W, Fu F, Lang Y, Wang W, Tong G, Liu Q, Cai X, Li X. A SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for simple and rapid detection and differentiation of highly pathogenic and classical type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus circulating in China. *Arch Virol*. 2012 Oct 16.

Charbonnel B, Schweizer A, Dejager S. Combination therapy with DPP-4 inhibitors and insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: what is the evidence? *Hosp Pract (1995)*. 2013 Apr;41(2):93-107.

Chen X, Hermansen K, Xiao J, Bystrup SK, O'Driscoll L, Jeppesen PB. Isosteviol has beneficial effects on palmitate-induced α -cell dysfunction and gene expression. *PLoS One*. 2012;7(3):e34361.

Christensen M, Bagger JJ, Vilsbøll T, Knop FK. The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy. *Rev Diabet Stud*. 2011 Fall;8(3):369-81.

Christensen M, Bagger JJ, Vilsbøll T, Knop FK. The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy. *Rev Diabet Stud*. 2011 Fall;8(3):369-81.

Cnop M, Ladriere L, Igoillo-Esteve M, Moura RF, Cunha DA. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β -cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab.* 85 2010 Oct;12 Suppl 2:76-82. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01279.x. Review.

Concannon P, Rich SS, and Nepom GT. Genetics of type 1a diabetes. *N Engl J Med.*, 360(16):1646-54, 2009

Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology.* 2012 Apr;142(4):711-725.

D'Alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2011 Oct;13 Suppl 1:126-32.

Deacon CF, Ahrén B. Physiology of incretins in health and disease. *Rev Diabet Stud.* 2011 Fall;8(3):293-306. doi: 10.1900/RDS.2011.8.293. Epub 2011 Nov 10. Review.

DeFronzo RA, Ratner RE, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD: *Diabetes Care* 28, 1092-1100, 2005; Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. *Diabetes Care* 27: 2628-2635, 2004; Kendall DM, Riddle MC, Rosenstock J, Zhuang D, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. *Diabetes Care* 28, 1083-1091, 2005

Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, et al. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2004;53:624-32

Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electrontransport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474–482.

Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electrontransport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474–482.

Dong CX, Brubaker PL. Ghrelin, the proglucagon-derived peptides and peptide YY in nutrient homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Dec;9(12):705-15.

Donia D, Petrinca AR, Divizia M. A strategy to increase the specificity of Syber Green I qRT-PCR in hepatitis A detection. *New Microbiol.* 2010 Jul;33(3):215-22.

Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol.* 2003 Feb;17(2):161-71. Review.

Egecioglu E, Engel JA, Jerlhag E. The glucagon-like Peptide 1 analogue, exendin-4, attenuates the rewarding properties of psychostimulant drugs in mice. *PLoS One.* 2013 Jul 16;8(7):e69010.

epidemic. *Nature* 2001;414:782-7

Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R: *Endocrinology* 143, 4397-4408, 2002; Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R . *Endocrinology* 144, 5149-5158,2003

Ferrannini E, Mari A. Beta-cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal. *Diabetologia* 2004;47:943-56.

Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013 Jan 1;9(1):25-53.

Gale E. Incretin therapy: should adverse consequences have been anticipated? *BMJ.* 2013 Jun 10;346:f3617.

Gero L. Type 1 diabetes mellitus: pathogenesis, symptoms and therapy]. *Orvb Hetil*,2010, 151((13):533-9. Review

Gier B, Butler PC, Lai CK, Kirakossian D, DeNicola MM, Yeh MW. Glucagon like peptide-1 receptor expression in the human thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jan;97(1):121-31. doi: 10.1210/jc.2011-2407.

Ginter E, Simko V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:42-50. Review.

Goldberg E and Krause I. Infection and type 1 diabetes mellitus - a two edged sword? *Autoimmun Rev.*, 8(8):682{6, 2009.

Goossens GH. The renin-angiotensin system in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Obes Facts.* 2012;5(4):611-24.

Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B: Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem*272 :30261 –30269,1997

Guerci B, Monnier L, Serusclat P, Petit C, Valensi P, Huet D, Raccach D, Colette C, Quéré S, Dejager S. Continuous glucose profiles with vildagliptin versus sitagliptin in add-on to metformin: results from the randomized Optima study. *Diabetes Metab.* 2012 Oct;

Gupta D, Krueger CB, Lastra G. Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of β -cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev.* 2012 Mar;8(2):76-83. Review.

Gupta NA, Kolachala VL, Jiang R, Abramowsky C, Romero R, Fifadara N, Anania F,

Gupta V. Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013 May;17(3):413-21.

H, et al. Abnormal glucagon response to arginine and its normalization in obese hyperinsulinemic patients with glucose intolerance: importance of insulin action on pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 1991;34:801-6

Habener JF, Stanojevic V. α -cell role in β -cell generation and regeneration. *Islets*. 2012 May-Jun;4(3):188-98.

Hamaguchi K, Leiter EH. Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines. Viability, secretory function, and MHC antigen expression. *Diabetes* 39: 415-425, 1990

Han YB, Wang MN, Li Q, Guo L, Yang YM, Li PJ, Wang W, Zhang JC. MicroRNA-34a contributes to the protective effects of glucagon-like peptide-1 against lipotoxicity in INS-1 cells. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Dec

Heller RS, Aponte GW: Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like

Hillar M, Orudiakomo S. Identification of messenger RNA for glutamate dehydrogenase using a spectrophotometric probe. *Mol Biol Rep*. 1986;11(3):131-5.

Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. Cunha DA, Hekerman P, Ladriere L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P, Rutter GA, Eizirik DL, Cnop M. *J Cell Sci*. 2008 Jul 15;121(Pt 14):2308-18.

Inter E, Simko V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. *Adv Exp Med Biol*. 2012;771:42-50. Review

Ish-Shalom S, Lichter A. Analysis of fungal gene expression by Real Time quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2010;638:103-14.

Istat 2012, elaborazione Iss -<http://www.epicentro.iss.it>.

Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V: Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic β -cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism*49 :532 –536,2000

Jensen EC. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction to measure mRNA: use, limitations, and presentation of results. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012 Jan

Johnson EL. Glycemic variability in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress and macrovascular complications. *Adv Exp Med Biol*. 2012;771:139-54. Review.

Jun HS. In vivo regeneration of insulin-producing beta-cells. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:627-40. doi: 10.1007/978-90-481-3271-3_27. Review.

Kahn SE. The relative contribution of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003;46:3-19.

Kang HM, Kang Y, Chun HJ, Jeong JW, Park C. Evaluation of the in vitro and in vivo angiogenic effects of exendin-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 26;434(1):150-4.

Kazafeos K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Aug;93 Suppl 1:S32-6. doi: 10.1016/S0168-8227(11)70011-0. Review.

Kierat S, Leś K, Przybylski M, Dzieciatkowski T, Młynarczyk G. [TaqMan fluorescent probe-based real-time PCR assay for detection of varicella-zoster virus]. *Med Dosw Mikrobiol.* 2012;64(2):139-49.

Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev.* 2008 Dec;60(4):470-512. doi: 10.1124/pr.108.000604. Epub 2008 Dec 12. Review

Knechtle S, Kirk A. The glucagon-like peptide-1 receptor agonist Exendin 4 has a protective role in ischemic injury of lean and steatotic liver by inhibiting cell death and stimulating lipolysis. *Am J Pathol.* 2012 Nov;181(5):1693-701.

Lankas GR, Leiting B, Roy RS, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type-2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. *Diabetes* 2005;54:2988-2994.

Las G, Serada SB, Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J Biol Chem.* 2011 Dec 9;286(49):42534-44. Epub 2011 Aug 21

Lau DC. Metabolic syndrome: perception or reality? *Curr Atheroscler Rep.*, 11(4):264{271, 2009.

Laviola L, Leonardini A, Melchiorre M, Orlando MR, Peschechera A, Bortone A, Paparella D, Natalicchio A, Perrini S, Giorgino F. Glucagon-like peptide-1 counteracts oxidative stress-dependent apoptosis of human cardiac progenitor cells by inhibiting the activation of the c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway. *Endocrinology.* 2012 Dec;153

Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, Biden

Le Roux CW, Borg C, Wallis K, Vincent RP, Bueter M, Goodlad R, Ghatei MA, Patel A, Bloom SR, Aylwin SJ. Gut hypertrophy after gastric bypass is associated with increased glucagon-like peptide 2 and intestinal crypt cell proliferation. *Ann Surg.* 2010 Jul;252(1):50-6.

Lightfoot YL, Chen J, Mathews CE. Oxidative stress and beta cell dysfunction. *Methods Mol Biol.* 2012;900:347-62. doi: 10.1007/978-1-60761-720-4_17.

Liu Y, Schubert D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem.* 1997 Dec;69(6):2285-93.

Lupi R, Del Guerra S, Fierabracci V, Marselli L, Novelli M, Patane G, Boggi U, Mosca F, Piro S, Del Prato S, Marchetti P. Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes.* 2002 Feb;51 Suppl 1:S134-7.

Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, Novelli M, Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M, Soleti A, Filipponi F, Mosca F, Boggi U, Del Prato S, Masiello P, Marchetti P. Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. *Diabetes Metab.* 2007 Nov;33(5):340-5.

Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P. 84 Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes.* 2002 May;51 (5):1437-42.

Maedler K, Spinas GA, Dytar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY: Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes* 50 :69 – 76, 2001

Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S. The pancreatic beta-cell in human

Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S. The pancreatic beta-cell in human Type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Mar;16 Suppl 1:S3-6.

Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regul Pept* 2008;146:4-11; Rhodes CJ. Type 2 diabetes - a matter of beta-cell life and death *Science* 2005;307:380-4

Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regul Pept* 2007;29;

Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, Del Guerra S, D'Aleo V, Piro S, Marselli L, Boggi U, Filipponi F, Tinti L, Salvini L, Wollheim CB, Purrello F, Dotta F. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia.* 2012 Dec;55(12):3262-72.

Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Marselli L, Boggi U. The beta-cell in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2010;654:501-14. Review.

Mauroy A, Poel WH, Honing RH, Thys C, Thiry E. Development and application of a SYBR green RT-PCR for first line screening and quantification of porcine sapovirus infection. *BMC Vet Res.* 2012 Oct 17;8(1):193.

McGarry JD, Dobbins RL: Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42:128–138, 1999

Med Bull. 2011 Feb;58(2):B4248. Review.

Milburn JL Jr, Hirose H, Lee YH, Nagasawa Y, Ogawa A, Ohneda M, BeltrandelRio H, Newgard CB, Johnson JH, Unger RH: Pancreatic β -cells in obesity: evidence for induction of functional, morphologic, and metabolic abnormalities by increased long chain fatty acids. *J Biol Chem* 270 :1295 –1299, 1995

Monjezi R, Tan SW, Tey BT, Sieo CC, Tan WS. Detection of hepatitis B virus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR. *J Virol Methods*. 2012 Sep 27.

Moreno LA, Cox KL. Quantification of dsDNA using the Hitachi F-7000 Fluorescence Spectrophotometer and PicoGreen dye. *J Vis Exp*. 2010 Nov 5;(45). pii: 2465. doi: 10.3791/2465.

Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1986 Jan;29(1):46-52.

Nauck MA, El-Ouaghli A, Gabrys B, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Gallwitz B, Schmidt WE, Meier JJ. Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept*. 2004 Nov 15;122(3):209-17.

Novelli M, D'Aleo V, Lupi R, Paolini M, Soleti A, Marchetti P, Masiello P. Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a nonobese mouse diabetes model. *Pancreas*. 2007 Nov;35(4):e10-7.

Nyalakonda K, Sharma T, Ismail-Beigi F. Preservation of beta-cell function in type 2 diabetes. *Endocr Pract*. 2010 Nov-Dec;

Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S. Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:504-10

Ou D, Metzger DL, Wang X, Huang J, Pozzilli P, Tingle AJ. TNF-related apoptosis-inducing ligand death pathway-mediated human beta-cell destruction. *Diabetologia*. 2002 Dec;45(12):1678-88.

Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, D'Onofrio F. Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 38 :1295 –1299,1995

Patzelt C, Schiltz E. Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Aug;81(16):5007–5011.

peptide-1 (7-36)amide. *Am J Physiol* 269:G853–G860, 1995

Perfetti R, Hui H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. *Horm Metab Res*. 2004 Nov-Dec;36(11-12):804-10. Review.

Perfetti R, Hui H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. *Horm Metab Res*. 2004 Nov-Dec;36(11-12):804-10. Review

Petersen AB, Christensen M. Clinical potential of lixisenatide once daily treatment for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2013 Jun 17;6:217-31.

Portha B, Giroix MH, Turrel-Cuzin C, Le-Stunff H, Movassat J. The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. *Methods Mol Biol.* 2012;933:125-59.

Proietto J, Nankervis A, Aitken P, Caruso G, Alford F. Glucose utilization in Type 1. Csorba TR, Lyon AW, Hollenberg MD. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2010, 47(2):51-71

Rajtak U, Leonard N, Bolton D, Fanning S. A Real-Time Multiplex SYBR Green I Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Screening of Salmonella Serotypes Prevalent in the European Union. *Foodborne Pathog Dis.* 2011 Mar 7

Ris F, Hammar E, Bosco D, Pilloud C, Maedler K, Donath MY, Oberholzer J, Zeender E, Morel P, Rouiller D, Halban PA. Impact of integrin-matrix matching and inhibition of apoptosis on the survival of purified human beta-cells in vitro. *Diabetologia.* 2002 Jun;45(6):

Ritz-Laser B, Meda P, Constant I, Klages N, Charollais A, Morales A, Magnan C, Ktorza A, Philippe J: Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate. *Endocrinology*140 :4005 –4014,1999

Rorsman P, Braun M, Zhang Q. Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. *Cell Calcium.* 2012 Mar-Apr;51(3-4):300-8.

Roussel Y, Wilks M, Harris A, Mein C, Tabagchali S. Evaluation of DNA extraction methods from mouse stomachs for the quantification of *H. pylori* by real-time PCR. *J Microbiol Methods.* 2005 Jul;62(1):71-81.

S. Brunton. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. *Postgrad Med,* 121:68{81, 2009.

Sako Y, Grill VE: A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology*127 :1580 –1589,1990;Elks ML

Shao S, Yang Y, Yuan G, Zhang M, Yu X. Signaling molecules involved in lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *DNA Cell Biol.* 2013 Feb;32(2):41-9.

Shen XX, Li HL, Pan L, Hong J, Xiao J, Hermansen K, Jeppesen PB, Li GW. Glucotoxicity and α cell dysfunction: involvement of the PI3K/Akt pathway in glucose-induced insulin resistance in rat islets and clonal α TC1-6 cells. *Endocr Res.* 2012;37(1):

Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH: Fatty acid-induced β -cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 :2498 –2502,199

Shyangdan D, Cummins E, Royle P, Waugh N. Liraglutide for the treatment of type 2 diabetes. *Health Technol Assess.* 2011 May;15 Suppl 1:77-86.

Smeekens SP, Avruch AS, LaMendola J, Chan SJ, Steiner DF. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 15;88(2):340–344.

Song SH. Emerging type 2 diabetes in young adults. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:51-61. Review.

Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. *Adv Exp Med*

Stadler K. Oxidative stress in diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:272-87. Review.

Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res.* 2006 Jan;45(1):42-72.

The Islets of Langerhans Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 654
Islam, Md. Shahidul (Ed.). 2010.

TJ. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2007 Apr;50(4):752-63

Tornehave D, Kristensen P, Rømer J, Knudsen LB, Heller RS. Expression of the GLP-1 receptor in mouse, rat, and human pancreas. *J Histochem Cytochem.* 2008 Sep;56(9):841-51.

Tremblay AJ, Lamarche B, Deacon CF, Weisnagel SJ, Couture P. Effect of sitagliptin therapy on postprandial lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2011 Apr;13(4):366-73.

Type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Mar;16 Suppl 1: S3-6. Epub 2006

Umpierrez GE, Korytkowski M. Is Incretin-Based Therapy Ready for the Care of Hospitalized Patients With Type 2 Diabetes?: Insulin therapy has proven itself and is considered the mainstay of treatment. *Diabetes Care.* 2013 Jul;36(7):2112-7.

Unger RH, Aguilar-Parada E, Muller WA, Eisentraut AM. Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1970;49:847-8

Van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:792393.

Watanabe A, Nishijima K, Zhao S, Zhao Y, Tanaka Y, Takemoto H, Strauss HW, Blankenberg FG, Tamaki N, Kuge Y. Quantitative determination of apoptosis of pancreatic β -cells in a murine model of type 1 diabetes mellitus. *J Nucl Med.* 2012 Oct;53(10):1585-91.

Weir GC, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Apr;1281:92-105.

Weir GC, Marselli L, Marchetti P, Katsuta H, Jung MH, Bonner-Weir S. Towards better understanding of the contributions of overwork and glucotoxicity to the beta-cell inadequacy of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009 Nov;11 Suppl 4:82-90.

Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, Bugliani M, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL. Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes.* 2005 Nov;54(11):3238-44.

Wojewoda CM, Spahlinger T, Harmon ML, Schnellinger B, Li Q, DeJelo C, Schmotzer C, Zhou L. Comparison of Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test version 2.0 (CAP/CTM v2.0) with other Real-time PCR Assays in HIV-1 Monitoring and Follow-up of Low-level Viral Loads. *J Virol Methods*. 2012 Oct 22

Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2300-8

Zarrinpar A, Loomba R. Review article: the emerging interplay among the gastrointestinal tract, bile acids and incretins in the pathogenesis of diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 Nov;36(10):909-21. doi: 10.1111/apt.12084. Epub 2012 Oct 11. Review.

Zhang LW, McMahon Tobin GA, Rouse RL. Oleic acid and glucose regulate glucagon-like peptide 1 receptor expression in a rat pancreatic ductal cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Oct 15;264(2):274-83

Zhou YP, Grill V: Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 80 :1584 –1590,1995

Zhou YP, Grill VE: Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93 :870 –876,1994

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414:782-7;

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes

Capitolo 8. Ringraziamenti

L'epilogo di questo percorso di studi trova la sua conclusione con questo lavoro, cui ho dedicato tante energie e sacrificio, ma soprattutto entusiasmo e passione.

Se sono arrivato al traguardo tanto ambito il merito è anche di tutte le persone che mi sono state vicine e mi hanno sostenuto con il loro aiuto.

Grazie alla mia famiglia per il sostegno psicologico e morale

Grazie di cuore al Dr. Roberto Lupi per il tempo dedicato alla stesura della tesi e aver reso il tirocinio non solo un semplice lavoro di internato ma un'esperienza estremamente positiva e ricca di insegnamenti

Ringrazio la Dott.ssa Veronica Sancho Bornez per avermi affiancato in questo lavoro e per l'aiuto che mi ha dato

Ringrazio inoltre per i consigli i miei correlatori, prof.ssa Irma Nardi e prof.ssa Antonella Del Corso

Grazie a tutti i professori del corso di Laurea per quello che mi hanno trasmesso con i loro insegnamenti, contribuendo ad arricchire il mio bagaglio culturale

Anche se solo grazie non basta, ringrazio Marilena per aver creduto in me in modo incondizionato, trasmettendomi la forza per superare i momenti più difficili di questo percorso.